

Aus dem Institut für Anatomie
der Humboldt-Universität zu Berlin (Charité)
Direktor: Prof. Dr. Th. G. Ohm



DISSERTATION

Einfluß der synaptischen Vesikelproteine Synaptophysin und Synaptobrevin auf Wachstum und Differenzierung der hippocampalen Zellkultur

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Martin Gorsleben
geb. am 03.07.1973 in Neuruppin

Dekan: Prof. Dr. M. Dietel

Gutachter: 1. PD Dr. med. G. Grosse
 2. Prof. Dr. med. M. Gratzl
 3. Dr. habil. rer. nat. W. Schulze

eingereicht: Dezember 1998

Datum der Promotion: 31.05.1999

1	Einleitung	4
1.1	Prinzipien neuronaler Entwicklung in der Zellkultur	4
1.2	Prinzipien synaptischer Transmission	4
1.3	Der Zyklus synaptischer Vesikel	6
1.4	Regulation der Membranfusion während der Exozytose	7
1.5	Die SNARE-Hypothese und ihre Modifikationen	8
1.6	Regulierung von Wachstum und Synaptogenese	10
1.6.1	Wachstum und Exozytose	10
1.6.2	Steuerung der Synaptogenese	10
1.7	Synaptophysin und Synaptobrevin – Proteine synaptischer Vesikel	11
1.8	Wirkungsweise und Nutzung clostridialer Neurotoxine	12
1.9	Die Synaptophysin-knock-out-Maus	14
2	Ziele der Arbeit	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Geräte und Chemikalien	16
3.1.1	Geräte	16
3.1.2	Chemikalien	17
3.1.3	Lösungen und Medien für die Zellkultur	18
3.1.4	Lösungen zur immunhistochemischen Gewebeaufbereitung	18
3.2	Versuchstiere	19
3.3	Methoden	19
3.3.1	Gewinnung der Zellkultur	19
3.3.2	Lichtmikroskopischer Nachweis der Proteine	20
3.3.3	Immunzytochemie für Zellkulturen (Avidin-Biotin-Methode)	20
3.3.4	Fluoreszenz-Methode	21
3.3.5	Elektronenmikroskopischer Nachweis (Preembedding-Methode)	21
3.3.6	Fotografische Dokumentation	22
3.3.7	Morphometrische Messungen	22
3.3.8	Nachweis von Proteinen mittels Westernblot	22
4	Ergebnisse	24
4.1	Charakterisierung der hippocampalen Zellkultur durch licht- und elektronenmikroskopische Darstellungen	24
4.1.1	Zelltypen, Zellwachstum und Zelldichte	24
4.1.2	Differenzierung subzellulärer Strukturen der hippocampalen Neurone	28
4.2	Verteilung der synaptischen Vesikelproteine Synaptobrevin und Synaptophysin während der Entwicklung der hippocampalen Zellkultur	32
4.2.1	Verteilung von Synaptophysin	32

4.2.2	Verteilung von Synaptobrevin	36
4.2.3	Synaptogenese und Verteilung der synaptischen Vesikelproteine Synaptophysin und Synaptobrevin im elektronenmikroskopischen Bild	37
4.3	Einfluß von Tetanustoxinbehandlung und Synaptophysin-Depletion auf die Entwicklung der hippocampalen Zellkultur	39
4.3.1	Einfluß der Spaltung von Synaptobrevin durch Tetanustoxin auf die Entwicklung der hippocampalen Zellkultur	39
4.3.2	Nachweis der Spaltung von Synaptobrevin im Western-Blot	44
4.3.3	Einfluß der Depletion von Synaptophysin auf die Entwicklung der hippocampalen Zellkultur	44
4.3.4	Einfluß der Depletion von Synaptophysin auf die Differenzierung subzellulärer Strukturen in der hippocampalen Zellkultur	46
4.3.5	Einfluß der Synaptophysin-Depletion im Western-Blot	47
4.4	Morphometrische Messungen	48
4.4.1	Einfluß der Synaptobrevin-Spaltung durch Tetanustoxin auf das Faserwachstum	48
4.4.2	Einfluß der Synaptophysin-Depletion auf das Neuritenwachstum	49
5	Diskussion	50
5.1	Die neuronale hippocampale Zellkultur	50
5.2	Fortsatzwachstum und neuronale Polarität in der hippocampalen Zellkultur	50
5.3	Rolle synaptischer Vesikelproteine beim neuronalen Wachstum	52
5.3.1	Rolle von Synaptophysin bei Wachstum und Entwicklung der hippocampalen Zellkultur	52
5.3.2	Rolle von Synaptobrevin bei Wachstum und Entwicklung der hippocampalen Zellkultur	55
6	ZUSAMMENFASSUNG	58
6.1	Schlußfolgerungen	59
7	Literaturverzeichnis	60
8	Tabellenverzeichnis	68
9	Abbildungsverzeichnis	68

1 Einleitung

Die Entwicklung und Differenzierung des Nervensystems ist ein zentrales und fachübergreifendes Forschungsgebiet der modernen Anatomie. Von der Entdeckung der Synapsen bis hin zur strukturellen Analyse molekularer Mechanismen ist in den letzten Jahrzehnten ein enormer Wissenszuwachs erreicht worden. Dieses Wissen bildet die Grundlage für das Verstehen reaktiver und kognitiver Prozesse wie Verhalten, Lernen und Gedächtnis.

Ein Schwerpunkt der neuroanatomischen Forschung ist die Untersuchung von Wachstum und Entwicklung neuronaler Zellen. Mechanismen der Fortsatzbildung und Polarisierung sowie die Bildung synaptischer Kontakte sind unerläßliche dynamische Prozesse der Neurogenese.

In Kultursystemen können diese Vorgänge an neuronalen Zellen beobachtet und quantifiziert werden. Durch licht- und elektronenmikroskopische Beobachtung ist die Beantwortung spezifischer Fragestellungen möglich. So kann z.B. die Verteilung neuronaler Proteine entwicklungsabhängig untersucht werden. Die gezielte Beeinflussung einzelner Proteine durch die Zugabe von Neurotoxinen zum Kultursystem ist möglich und läßt Schlußfolgerungen auf ihre Bedeutung zu. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde als Kultursystem die hippocampale Zellkultur 17 Tage alter Mäuseembryonen verwendet.

1.1 Prinzipien neuronaler Entwicklung in der Zellkultur

Werden neuronale Zellen zur Aussaat in ein Kultursystem gebracht, so bilden sie ein Axon und mehrere Dendriten aus [22]. Diese beiden Fortsatztypen können durch ihre Morphologie und Proteinzusammensetzung unterschieden werden. Dendriten bilden weit verzweigte Netze (griech. *dendron* = Baum), wobei der Querschnitt nach jeder Einzelverzweigung abnimmt. Dadurch bleibt der Gesamtquerschnitt konstant oder nimmt leicht ab. Axone sind dünner als Dendriten und verzweigen sich oft weiter entfernt vom Zelleib. Der Durchmesser der einzelnen Axonverzweigungen nimmt nur geringfügig ab und der Gesamtquerschnitt wird größer (Übersicht in [22]). In der Wachstumsgeschwindigkeit und der Reihenfolge des Auswachsens differieren beide Fortsatztypen [2]. Auch die Verteilung von Zellorganellen ist unterschiedlich. So finden sich Teile des Golgiapparates außer im Perikaryon nur in proximalen Dendriten, nicht aber im Axon. Ribosomen sind ebenfalls nur im somatodendritischen Teil der Zelle zu finden [23]. Verschiedene Strukturproteine sind Marker für die unterschiedlichen Fortsätze. MAP-2 (microtubuli-associated protein, Typ 2) ist in Dendriten lokalisiert [98], während GAP-43 (growth-associated protein) spezifisch für Axone ist [99].

Die Mechanismen, die zur Steuerung des neuronalen Wachstums beitragen, sind noch weitestgehend ungeklärt. Es erfolgt ein gerichteter Transport neu synthetisierter Elemente vom Soma in die Fortsätze, wobei Interaktionen von Proteinen des Zytoskeletts, Transportproteinen, Vesikelpoteinen und Plasmamembranproteinen nötig sind. Endpunkt der Transportprozesse während des Wachstums ist der Einbau neuer Elemente in die Plasmamembran, was vorwiegend in sog. Wachstumskolben (engl. growth cones) durch Exozytose geschieht [9,12]. Exo- und Endozytosevorgänge sind auch in reifen Neuronen Grundlage von Umbau- und Erhaltungsprozessen sowie Voraussetzung für die Sekretion von Neurotransmittern. Innerhalb der Zelle ergeben sich verschiedene Exozytosewege. Konstitutive und regulierte Exozytose werden unterschieden (Übersicht in [134]), wobei jeder der Wege vom Golgiapparat oder von Endosomen ausgehen kann [114]. Die regulierte Exozytose ist eine Spezialisierung bestimmter Zellen und benötigt Triggermechanismen, wie z.B. den Ca^{2+} -Einstrom bei der Transmitterexozytose. Sie ist ein schneller und phasenhafter Mechanismus. Die konstitutive Exozytose ist dagegen ein langsamer und kontinuierlicher Prozeß in allen Zellen, der z.B. den erwähnten Membraneinbau während des Wachstums reguliert. Beide Wege scheinen jedoch grundlegende molekulare Mechanismen gemeinsam zu haben [14,36,37]. Am Beispiel der regulierten Exozytose bei der Neurotransmitter-freisetzung sollen nachfolgend grundlegende Prinzipien der Exozytose erläutert werden.

1.2 Prinzipien synaptischer Transmission

An den Kontaktstellen von Axonen und Dendriten bzw. Somata bilden sich Synapsen aus [14,15]. Zwei Typen von Synapsen können unterschieden werden. Elektrische Synapsen leiten Aktionspotentiale über gap junctions weiter. Durch Connexine (Tunnelproteine) wird der etwa 2 nm große Interzellularspalt überbrückt und ein Ionentransport ermöglicht. Der Stromfluß erregt

direkt das postsynaptische Neuron. Aufgrund geringer Latenz zwischen Signal und Reaktion ist so die Synchronisation von Zellverbänden möglich. Die Übertragung in elektrischen Synapsen kann bidirektional erfolgen. Eine weitaus größere Rolle spielen bei Säugetieren die chemischen Synapsen, die aus Präsynapse, synaptischem Spalt und Postsynapse bestehen. In der Präsynapse befinden sich synaptische Vesikel, die Transmitterstoffe enthalten. Das Aktionspotential führt in der Präsynapse zum Öffnen spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle. Der Anstieg freier Ca^{2+} -Ionen bewirkt das Verschmelzen synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran. Der Neurotransmitter wird exozytotisch in den 10 bis 40 nm großen synaptischen Spalt entleert und diffundiert zur postsynaptischen Membran, wo er an spezifische Rezeptormoleküle bindet. Diese lösen die Öffnung oder Schließung postsynaptischer Ionenkanäle aus, was eine Depolarisation (Erregung) oder Hyperpolarisation (Hemmung) der postsynaptischen Membran zur Folge hat. Der Transmitterstoff wird enzymatisch abgebaut oder durch Gliazellen aus dem synaptischen Spalt entfernt. Ein Teil wird durch Endozytose wieder in die Präsynapse aufgenommen. Die Übertragung an chemischen Synapsen erfolgt unidirektional, kann aber über prä- oder postsynaptische Inhibition durch andere Neurone beeinflusst werden.

Neurotransmitterhaltige synaptische Vesikel werden in zwei Klassen unterteilt. Kleine synaptische Vesikel (small synaptic vesicles = SSVs) sind 40 bis 60 nm groß und erscheinen ultrastrukturell klar. Sie enthalten „klassische“ Neurotransmitter, wie Acetylcholin, Glycin, GABA oder Glutamat. Die Freisetzung der Transmitter erfolgt innerhalb von Millisekunden und die Wirkung beschränkt sich auf direkt benachbarte Zellen [20]. Größere Vesikel mit 70 bis 120 nm Durchmesser erscheinen ultrastrukturell dichter und werden *large dense core vesicles* (LDCVs) genannt. Sie enthalten vorwiegend Neuropeptide, z.B. Substanz P, Enkephaline oder Hormone. Nach ihrer Freisetzung wirken diese Stoffe über längere Zeit und auch an entfernter gelegenen Zellen [20]. In endokrinen Zellen sind ebenfalls zwei entsprechende Vesikeltypen gefunden worden: SLMVs (small synaptic-like microvesicles) entsprechen den SSVs und endokrine Sekretgranula sind den LDCVs ähnlich. Bruns und Jahn (1995) konnten für beide Vesikeltypen unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen und verschiedene Reaktionszeiten auf Aktionspotentiale feststellen. Die Exozytose von SSVs vollzog sich innerhalb der ersten 2 ms, während LDCVs nach etwa 10 ms ihren Inhalt entleerten. SSVs setzten innerhalb der ersten 60 μs den größten Anteil des Transmitters frei, was die Autoren vermuten ließ, daß die Exozytose durch das Öffnen eines vorher gebildeten Fusionsapparates zustande kam [121]. Die folgenden Ausführungen konzentrieren sich auf die regulierte Exozytose von SSVs und die besondere Rolle des Fusionsapparates.

1.3 Der Zyklus synaptischer Vesikel

Synaptische Vesikel haben zwei verschiedene Aufgaben: sie müssen Neurotransmitter aufnehmen und speichern und Fusionsprozesse mit der Plasmamembran und Endosomen ermöglichen [102]. Der chronologische Ablauf wird als Vesikelzyklus bezeichnet. Neu synthetisierte Vesikelproteine werden in Vesikeln vom Zellkörper zum Nervenende transportiert. Dabei durchlaufen die Vesikel mehrere Fusions- und Endozytosevorgänge mit der Plasmamembran von Soma und Axon, die wahrscheinlich zur Reifung des synaptischen Vesikels nötig sind [15]. Funktionell reife synaptische Vesikel in der Präsynapse nehmen aktiv Neurotransmitter auf. Dann erfolgt der Transport des synaptischen Vesikels zur Plasmamembran. An aktiven Zonen existieren räumlich zwei Gruppen von Vesikeln. Ein Teil liegt der präsynaptischen Membran an (sog. gedockte Vesikel) und der andere Teil bildet den sog. Reservepool. Der Vorgang der spezifischen Anbindung eines synaptischen Vesikels an die präsynaptische Plasmamembran wird im folgenden Text als Docking bezeichnet.

Der nach der Membrandepolarisation folgende Ca^{2+} -Einstrom triggert die Fusion des gedockten Vesikels mit der Plasmamembran. Es erfolgt die Freisetzung des Transmitters in den synaptischen Spalt. Der leere Vesikel wird endozytiert, was durch eine Umhüllung (sog. coating) des Vesikels mit Clathrin ermöglicht wird. Der Vesikel verliert diese Hülle im Zytoplasma. Über ein endosomales Zwischenstadium wird dann wieder ein synaptischer Vesikel hergestellt (Vesikelrecycling), der mit Transmitter beladen werden kann und danach für einen erneuten Exo-/Endozytose-Zyklus zur Verfügung steht. Der gesamte Zyklus dauert etwa 1 min, wovon Fusion und Exozytose weniger als 1 ms und die Endozytose weniger als 5 s beanspruchen [119]. Die restliche Zeit wird für das Vesikelrecycling benötigt, wobei ein Teil der Vesikel einen schnelleren Weg geht, d.h. nicht das endosomale Stadium durchläuft. Durch diesen Mechanismus könnte die neuronale Zelle in der Lage sein, kurzfristig die Vesikelverfügbarkeit zu regulieren [130]. Dieser Zyklus synaptischer Vesikel ist, in Anlehnung an Südhof und Jahn 1991 [102], in der Abb. 1 schematisch dargestellt.

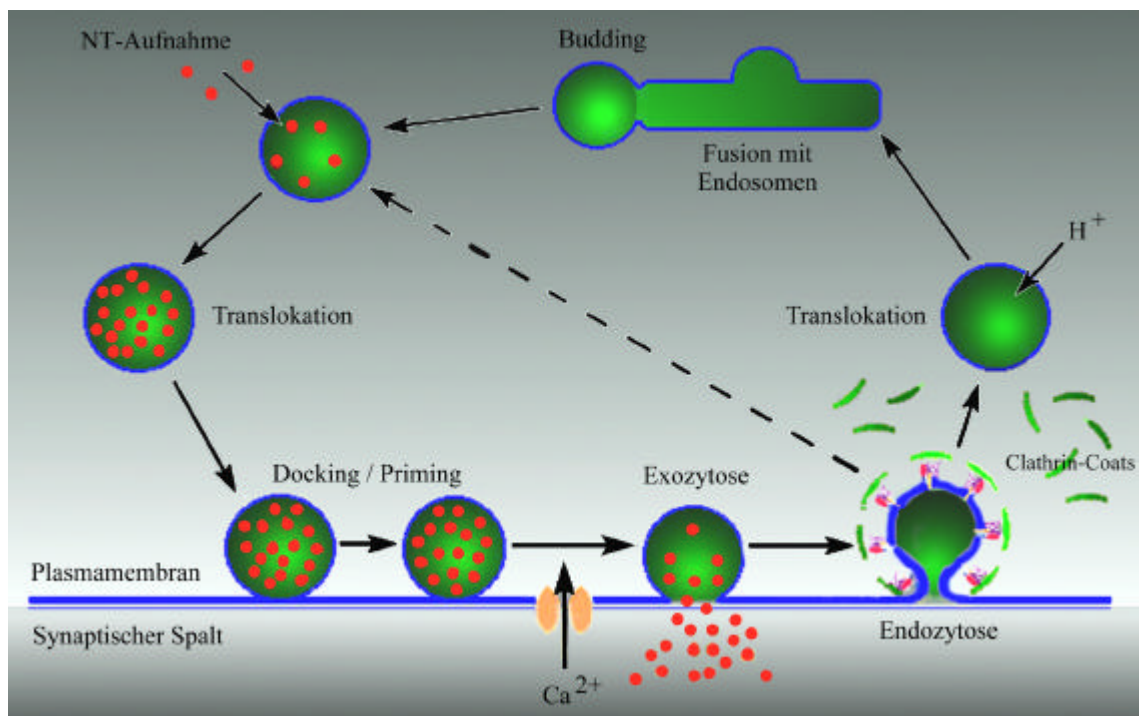


Abb. 1: Der Zyklus synaptischer Vesikel, modifiziert nach [102]. Nach Aufnahme des Neurotransmitters (NT) gelangt der Vesikel an die präsynaptische Plasmamembran (Docking), durchläuft ein Stadium der Reifung (Priming) und ist dann fähig zur Exozytose. Anschließend wird die Vesikelmembran Clathrin-vermittelt endozytiert. Über ein endosomales Zwischenstadium (Fusion mit Endosomen, Abschnürung = Budding) oder auf kürzerem Weg (gestrichelter Pfeil) wird der Vesikel für einen neuen Zyklus rekrutiert.

1.4 Regulation der Membranfusion während der Exozytose

Im folgenden soll auf die Prozesse von Docking und Fusion näher eingegangen werden. Große Fortschritte bei der Analyse der zugrundeliegenden Mechanismen ergaben sich durch die Entdeckung und Charakterisierung verschiedener Proteine, die bei der Transmitterfreisetzung beteiligt sind. Diese Proteine befinden sich an der synaptischen Vesikelmembran, an der Plasmamembran und im Zytosol. Für Aufnahme und Speicherung des Neurotransmitters sind am synaptischen Vesikel u.a. eine Protonenpumpe mit mehreren Untereinheiten, Neurotransmitter-Transportproteine, Cytochrom b_{561} und SV2 (synaptic vesicle protein 2) lokalisiert. Für die Prozesse von Docking und Fusion sind Synaptotagmin, Synaptophysin, Synapsin, rab3A und Synaptobrevin wichtige Proteine in bzw. an der Vesikelmembran. Syntaxin, SNAP-25 (synaptosomal associated protein of 25 kDa) und GAP-43 sind als plasmamembrangebundene Proteine entdeckt worden. Syntaxin und SNAP-25 wurden allerdings inzwischen auch an der Membran synaptischer Vesikel beschrieben [88]. Zahlreiche Isoformen der Proteine sind in Hefekulturen, Wirbellosen und Säugetieren nachgewiesen worden und bilden Protein-familien mit z.T. hochgradig konservierten Sequenzhomologien. Einen Überblick über wichtige Vertreter dieser Proteinfamilien gibt die folgende Tabelle.

Protein	Beschreiber	vermutete Funktionen
Synaptotagmin	Perin et al. 1991 [103]	Ca^{2+} -Rezeptor, Dockingprotein
Synaptophysin	Jahn et al. 1985 [40], Wiedenmann/Franke 1985 [41]	Regulator beim Docking, Strukturprotein synaptischer Vesikel, Kanal oder Pore
Synaptobrevin	Trimble et al. 1988 [94], Baumert et al. 1989 [70]	Rolle bei Fusion (Fusionskomplex)
Synapsin	DeCamilli et al. 1983 [108]	Interaktion mit Zytoskelett, Regulatorprotein
Syntaxin	Bennett et al. 1992 [109]	Rolle bei Docking und Fusion (Fusionskomplex)
SNAP-25	Oyler et al. 1989 [105]	Rolle bei Fusion (Fusionskomplex)
rab3 (a,b,c,d)	Matsui et al. 1988 [104]	GTPasen, Regulation des Membrantransports
α -, β -, γ -SNAP	Clary et al. 1990 [106]	nötig für NSF-Anbindung an Fusionskomplex
NSF	Wilson et al. 1989 [110]	ATPase, Rolle bei Fusion / Vesikelpriming

Tab. 1: Übersicht einiger Vertreter von wichtigen Proteinfamilien der regulierten Exozytose

Der Mechanismus der Ca^{2+} -regulierten Exozytose ist Gegenstand umfangreicher Forschungen. Die genaue Interaktion der beteiligten Proteine bei Docking und Fusion wurde erst in den letzten Jahren zunehmend aufgeklärt. Dabei stand die Analyse der strukturellen und der zeitlichen Abfolge im Vordergrund. Verschiedene zytosolische Proteine, die essentiell für die Membranfusion sind, wurden gefunden. Durch die Fähigkeit, den interzisternalen Golgi-Transport in einem zellfreien System wiederherzustellen, entdeckten Wilson et al. das *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion-Protein (NSF) [110]. NSF benötigt für seine Wirkung weitere zytosolische Faktoren, die als SNAPs (soluble NSF-attachment proteins) bezeichnet werden. Drei solcher SNAPs (α -, β - und γ -SNAP) wurden von Clary et al. beschrieben [106]. Ähnliche Proteine wurden auch in Hefekulturen nachgewiesen (SEC18 als NSF [110], SEC17 als α -SNAP [111]). SNAPs und NSF scheinen daher Komponenten eines ubiquitären Fusionsapparates zu sein. SNAPs binden an spezifische Rezeptoren in Membranen, erst danach bindet NSF an SNAPs [112]. Membrangebundene NSF-SNAP/SNAP-Rezeptor-Komplexe sedimentieren als gelöste Partikel von 20S, wie Wilson et al. 1992 feststellten [107]. NSF ist eine ATPase und enthält zwei ATP-Bindungsstellen [113]. Die Bildung des 20S-Komplexes ist unter Mg-ATP- γ S, einem nicht hydrolysierbaren Analogon von ATP, und mit reinem ATP möglich. Bei Zugabe von Mg-ATP dissoziiert der Komplex in sehr kurzer Zeit [107].

1.5 Die SNARE-Hypothese und ihre Modifikationen

Welche Membranbestandteile dienen nun als SNAP-Rezeptoren? Söller et al. konnten 1993 nachweisen, daß im 20S-Komplex Syntaxin, SNAP-25 und Synaptobrevin als SNAP-Rezeptoren existieren [81]. Damit wurden die Begriffe v-SNARE (vesicle membrane associated SNAP-Rezeptor) für Synaptobrevin und t-SNARE (target membrane associated SNAP-Rezeptor) für Syntaxin und SNAP-25 geprägt, da die beiden letzten Proteine bis dahin nur an der Plasmamembran nachgewiesen worden waren. Die Proteine können auch binäre Interaktionen eingehen, deren Bindungsstärke jedoch relativ gering ist. Alle drei Proteine bilden einen stabilen ternären Komplex. Dieser Komplex erwies sich als resistent gegen Behandlung mit SDS (Sodiumdodecyl-sulfat, ein Denaturant) [125]. Söller entdeckte außerdem einen Komplex mit einem Sedimentationskoeffizienten von 7S, der durch Interaktion von Synaptobrevin, Synapto-tagmin, Syntaxin und SNAP-25 gebildet wurde [116]. Die Verfügbarkeit von Syntaxin für die Komplexbildungen wird dabei durch das Protein n-sec1 geregelt, wie Pevsner et al. 1994 herausfanden [117]. Synaptophysin bestimmt anscheinend über eine Interaktion mit Synaptobrevin dessen Verfügbarkeit [66]. Ein simples Modell bot sich damit an, um die Exozytose zu erklären (sog. SNARE-Hypothese der Membranfusion, Rothman 1994 [115]). Beim Docking synaptischer Vesikel an die Plasmamembran könnten v-SNARE und t-SNAREs spezifisch reagieren und den 7S-Komplex bilden. Die Ca^{2+} -abhängige Dissoziation von Synaptotagmin vom 7S-Komplex würde die Bindung von SNAPs und NSF erlauben. Der entstehende 20S-Komplex könnte dann unter ATP-Hydrolyse durch NSF die Fusion ermöglichen. Die Spezifität des Prozesses für den jeweiligen Fusionsort (z.B. Golgiapparat, Endosomen oder Präsynapse) wäre durch Isoformen der beteiligten Proteine gegeben, wobei sich v-SNAREs auf Donatormembranen und t-SNAREs auf Akzeptormembranen befinden [116,115].

Die allgemeine Gültigkeit dieser SNARE-Hypothese für das Docking wurde allerdings durch nachfolgende Forschungsergebnisse in Frage gestellt. Jahn berichtete 1994 bereits über das Vorkommen von Syntaxin an der Membran synaptischer Vesikel [118], was von Kretschmar 1996 [88] und Otto et al. 1997 [87] für Syntaxin und auch SNAP-25 bestätigt wurde. In der Membran synaptischer Vesikel bilden Syntaxin, SNAP-25 und Synaptobrevin ohne Beteiligung von Plasmamembranbestandteilen einen ternären Komplex, der durch SNAPs und NSF dissoziiert werden kann [87]. Die strenge Zuordnung einzelner Proteine zu v- und t-SNAREs ist daher nicht sinnvoll. Auch die zeitliche Abfolge der Einzelschritte scheint anders zu sein, als in der SNARE-Hypothese postuliert. Die spezifische Inaktivierung von SNAP-25 oder Synaptobrevin durch clostridiale Neurotoxine bewirkt keine Abnahme gedockter Vesikel in der Präsynapse, die Exozytose wird jedoch gehemmt. Daher ist der o.g. Komplex eher bei der Fusion als beim Docking wichtig (Südhof, 1995 [119]). Für das Docking sind daher andere oder zusätzliche Prozesse, wie z.B. Interaktion zytoskelettaler Elemente, nötig (Übersicht in [120]). Die Dissoziation des Komplexes unter ATP-Hydrolyse durch NSF erfolgt anscheinend vor der Ca^{2+} -abhängigen Fusion, was ebenfalls nicht mit der genannten SNARE-Hypothese erklärt werden kann [119,121]. Mayer et al. beschrieben in Hefe eine Wirkung des NSF-Äquivalents vor dem Docking [123]. NSF kommt also eher eine Rolle beim Vorbereiten (Priming) synaptischer Vesikel auf die Exozytose zu, was vor dem Docking [87,122,90] oder nach der Fusion [96] möglich wäre. Letzteres wird durch Swanton et al. bestätigt, die den 20S-Komplex an Clathrin-umhüllten Vesikeln nachwiesen, also zu einem Zeitpunkt nach der Fusion [127].

Die Aufklärung der molekularen Struktur des Fusionskomplexes sowie die Analyse der Bindungen der einzelnen Proteine ist durch die Anwendung verschiedenster Techniken weit fortgeschritten. Sequenzanalysen von SNAP-25, Syntaxin und Synaptobrevin führten zur Entdeckung der bei der Komplexbildung beteiligten Bindungsstellen [125,124,126]. Aufgrund spezifischer Aminosäuresequenzen in diesen Bindungsstellen, den sog. heptagonalen Wiederholungen, haben alle drei Proteine die Fähigkeit, α -Helices zu bilden. Mehrere Autoren vermuteten 1994, daß diese Helices miteinander eine als coiled-coil bezeichnete Tertiärstruktur ausbilden, die für die Komplexbildung verantwortlich sein könnte [124,125]. Fasshauer et al. wiesen 1997 zusätzlich nach, daß die Interaktion von Syntaxin mit SNAP-25 dessen α -helikalen Anteil drastisch erhöht [126]. Die Struktur von NSF konnte elektronenmikroskopisch durch Hanson et al. 1997 dargestellt werden [122]. Zugleich zeigten die Autoren, daß der ternäre Komplex von Syntaxin, SNAP-25 und Synaptobrevin einen 14 nm langen und 4 nm breiten Stab darstellt, in dem 4 α -Helices miteinander gebündelt sind, von denen zwei SNAP-25 und je eine Syntaxin und Synaptobrevin gehören. Die C-terminalen Enden von Syntaxin und Synaptobrevin befinden sich auf derselben Seite, d.h. die Proteine liegen parallel und gestreckt

zueinander [122]. Diese parallele Ausrichtung wurde von Lin und Scheller bestätigt, die zugleich aber eine geknickte Lage favorisierten [96]. Poirier et al. wiesen zusätzlich nach, daß im Komplex beide beteiligten SNAP-25- α -Helices parallel zueinander und zu Syntaxin liegen [95]. Durch eine flexible Region in SNAP-25 und Synaptobrevin etwa in der Mitte des Komplexes könnte nach Ansicht der Autoren die Komplexbildung in zwei Schritten erfolgen. Zuerst bilden die N-terminalen Protein-enden ein metastabiles Zwischenstadium, dessen geknickte Konformation die Komplexbildung auch an gegenüberliegenden Membranen erlaubt. Durch Streckung dieses Komplexes würde sich das viersträngige parallele Bündel so ausrichten, daß die Membranen sehr dicht beieinanderliegen und dadurch die Fusion triggern könnten [95]. Sutton et al. konnten letztlich durch computergestützte Strukturanalyse den Komplex räumlich darstellen und vermuteten zusätzlich, daß die transmembranen Domänen von Synaptobrevin und Syntaxin ebenfalls α -Helices bilden können, was zur Verformung und Fusion der Doppellipidmembran führen würde [131].

Die Membranfusion könnte aufgrund dieser Ergebnisse folgendermaßen ablaufen: Nach einem SNAP- und NSF-abhängigen Primingschritt werden unter ATP-Hydrolyse bestehende Komplexe aus SNAP-25, Syntaxin und Synaptobrevin an einzelnen Membranen aufgelöst. Die freien Proteine sind bestrebt, den energetisch günstigen ternären Komplex zu bilden. Durch das Docking synaptischer Vesikel an die präsynaptische Membran wären Proteine von Vesikel- und Plasmamembran in der Lage, den Komplex zu formen, wobei die parallele Ausrichtung der Proteine eine dichte Anlagerung beider Membranen ermöglicht. Die Fusion der Doppellipidmembran könnte so gefördert werden [126,128,129,131]. Der ternäre Fusionskomplex reicht zwar theoretisch für eine spontane Fusion aus, allerdings wird dabei eine Halbwertszeit von ca. 10 min benötigt [128]. Regulative Prozesse sind also zusätzlich nötig, um die schnelle Reaktion auf ein Ca^{2+} -Signal zu gewährleisten. Die Lokalisation in der Nähe von Kalziumkanälen ist daher Voraussetzung und auch durch Interaktionen von SNAP-25, Syntaxin und Synaptotagmin mit präsynaptischen Kalziumkanälen gegeben (Übersicht in [144,145]). Der Prozeß des Docking ist weiterhin relativ ungeklärt. Verschiedene Proteine, z.B. Synaptotagmin, p115 oder Piccolo, könnten dabei eine Rolle spielen (Übersicht in [129]).

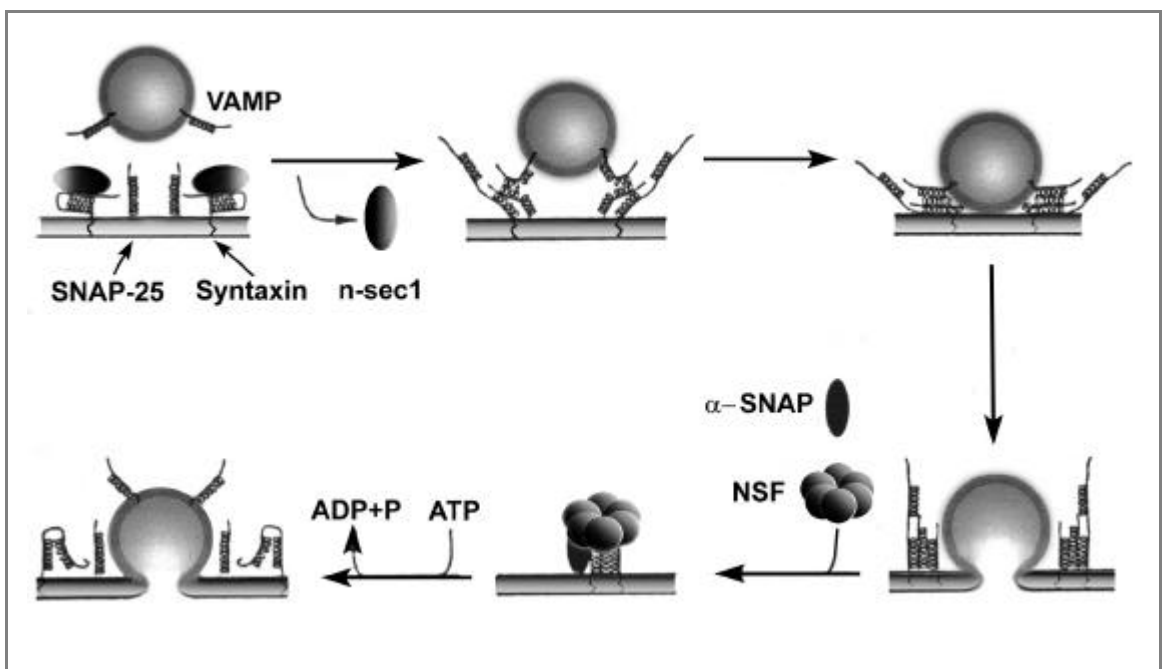


Abb. 2: Schema der Membranfusion, modifiziert nach Lin und Scheller 1997 [96]. Das Schema beschreibt einen möglichen Weg der Membranfusion bei der Exozytose. Syntaxin kann nach Dissoziation eines regulativen Proteins (n-sec1) einen Komplex mit SNAP-25 und Synaptobrevin (VAMP) bilden. Auch durch Auflösung vorhandener ternärer Komplexe an einzelnen Membranen könnte die Möglichkeit bestehen, neue Komplexe zwischen zwei Membranen zu bilden (Priming durch NSF, hier nicht dargestellt). Nach dem Docking des Vesikels an die präsynaptische Membran bildet sich das parallele viersträngige Bündel des Fusionskomplexes. Nach der Fusion wird der Komplex durch α -SNAP und NSF unter ATP-Hydrolyse aufgelöst und die Proteine stehen erneut zur Verfügung.

1.6 Regulierung von Wachstum und Synaptogenese

1.6.1 Wachstum und Exozytose

Die Wachstumskolben bestehen aus zwei verschiedenen Domänen: der peripheren, mikrofilamentreichen P-Domäne und der zentralen, vesikelreichen C-Domäne [11]. Die letztere ist für die Membranexpansion während des Wachstums verantwortlich [9]. Exozytische Prozesse sind dabei beteiligt [12,9]. Dies läßt vermuten, daß den Proteinen, die für die regulierte Exozytose verantwortlich sind, auch bei konstitutiven Wachstumsvorgängen eine wichtige Rolle zukommt. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, daß Axone und ihre growth cones synaptische Vesikel bzw. Vorstufen enthalten, noch bevor Synapsen ausgebildet sind [14]. Igarashi et al. bezeichneten 1997 diese Vesikelvorstufen als growth-cone-Vesikel (GCV) und unterschieden anhand der Proteinzusammensetzung der Vesikel drei Entwicklungsstadien des Axonendes [67]: Stadium 1 entspricht dem Wachstumskolben, Stadium 2 einem Zwischenstadium und Stadium 3 ist die reife Präsynapse. In allen 3 Stadien waren die Schlüsselproteine der regulierten Exozytose (SNAP-25, Syntaxin und Synaptobrevin) nachweisbar [67]. Daß synaptische Vesikel schon vor der Synaptogenese mit den molekularen Komponenten der regulierten Exozytose ausgestattet sind, konnten auch Krawzeski et al. 1995 nachweisen. Synaptische Vesikel in sich entwickelnden Neuronen durchliefen Depolarisations- und Kalzium-abhängige Exozytose, waren also funktionell aktiv [18]. Wachstum und Synaptogenese stehen also in engem zeitlichen und funktionellen Zusammenhang. Mechanismen der regulierten und der konstitutiven Exozytose scheinen auf der Interaktion gleicher oder zumindest ähnlicher Proteine zu beruhen, wie auch Südhof et al., Calakos und Scheller sowie Rothman und Wieland [114,36,37] in ihren Arbeiten feststellten. Daher stellt sich die Frage, ob Proteine synaptischer Vesikel eine funktionelle Bedeutung bei Wachstumsprozessen haben. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Frage am Beispiel von Synaptophysin und Synaptobrevin nachgegangen.

1.6.2 Steuerung der Synaptogenese

Molekulare Mechanismen, die die Ausbildung prä- und postsynaptischer Strukturen steuern könnten, sind bisher nur unzureichend geklärt. Synapsine spielen über die Interaktion von synaptischen Vesikeln und Zytoskelett eine Rolle (Übersicht in [101]). Retrograde Signale von postsynaptischen Elementen sind ebenso wie Triggersignale von präsynaptischer Seite her denkbar. So stellte Wallace 1996 an der neuromuskulären Endplatte fest, daß vom Axonende ein Protein freigesetzt wird (Agrin), das die synaptische Differenzierung und, zusammen mit einer muskelspezifischen Tyrosinkinase, die Ausbildung postsynaptischer Strukturen im Muskel triggert. Die Muskelfasern sollen über ein retrogrades Signal die präsynaptische Differenzierung steuern [33]. Die Mechanismen der Sortierung von synaptischen Vesikeln in das präsynaptische axonale Kompartiment und z.B. Glutamat-Rezeptoren in das postsynaptische dendritische Kompartiment der Neurone sind für die Synaptogenese entscheidend. Verderio et al. zeigten 1994, daß hippocampale Neurone schon nach 1 DIV Glutamatrezeptoren ausbilden, die anfangs über die gesamte Plasmamembran verteilt sind und sich erst später an synapsenbildenden somato-dendritischen Membranen konzentrieren. Zu diesem Zeitpunkt sind schon synaptische Vesikel im Axon vorhanden [93].

Hippocampale Neurone sind noch vor Abschluß der Synaptogenese in der Lage, Glutamat über kalziumabhängige Mechanismen freizusetzen, wobei die Ausstattung der Präsynapse mit verschiedenen Kalziumkanaltypen eine regulierende Funktion hat [19]. Diese Eigenschaft korreliert mit der erwähnten Fähigkeit zur regulierten Exozytose, ohne daß reife synaptische Kontakte ausgebildet sind. Glutamat könnte also als trophischer Faktor an der Regulation der Synapsenbildung beteiligt sein. Auch Stickoxid (NO) kommt über die Fähigkeit zur kalziumunabhängigen Transmitter-freisetzung eine regulierende Funktion zu, wie Meffert und Mitarbeiter feststellten [35]. Sporns und Jenkinson zeigten 1997, daß NO in der Lage ist, besonders in den ersten Entwicklungstagen hippocampaler Neurone kalziumunabhängige Exozytoseprozesse auszulösen. Da vermutlich eine retrograde Wirkung vorliegt, wären so z.B. reife Neurone in der Lage, Signale an unreife Neurone kalziumunabhängig weiterzugeben. Synaptogenese sowie Wachstum, Vernetzung und Zielverhalten der Neurone könnten über diese Signale gefördert werden [34].

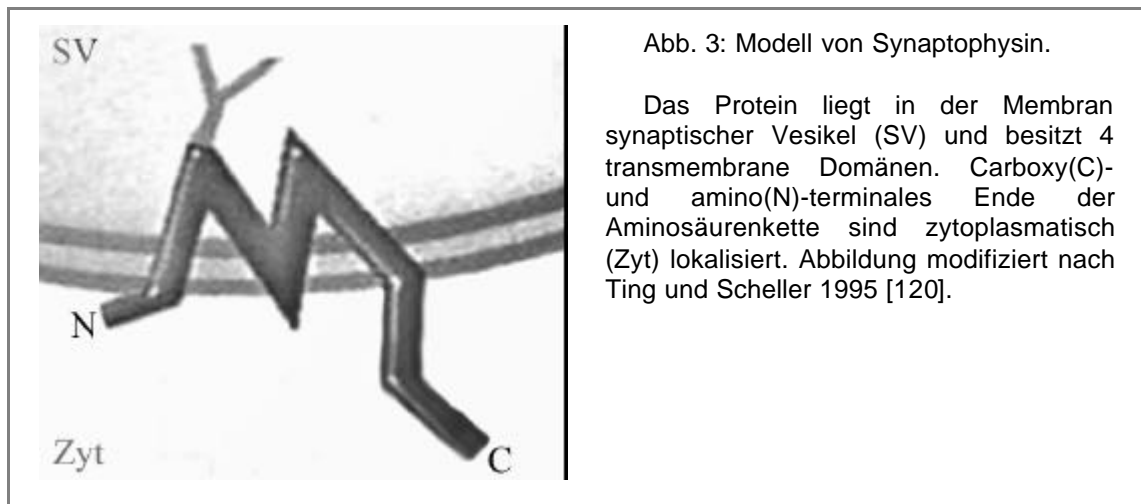
Um die Mechanismen der Synaptogenese näher zu ergründen, experimentierten Fletcher, De

Camilli und Banker 1994 mit Kokulturen verschieden alter Stadien [16]. Frisch dissoziierte Neurone wurden zu 4 Tage alten Zellkulturen gegeben. Es konnte festgestellt werden, daß die Axone der neu hinzugegebenen Neurone bereits nach 1 DIV synaptische Kontakte mit den reifen Neuronen eingingen. Wenn Axone reifer Zellen die unreifen Neurone kontaktierten, kam es erst nach 3 Tagen in Kokultur zur Synapsenbildung [16]. Axone der hippocampalen Neurone besitzen also die Fähigkeit, präsynaptische Strukturen bereits kurz nach Aussaat unter der Voraussetzung auszubilden, daß reife postsynaptische Strukturen vorhanden sind. Präsynaptisch funktionsfähige Strukturen werden zeitgleich mit der Etablierung des Axons erreicht, während die Reifung der Postsynapse entscheidend für die Differenzierung der Synapse nach 3 bis 4 DIV ist. Die postsynaptische Reifung scheint daher der zeitlich limitierende Faktor bei der Synapsenbildung zu sein.

Ob die funktionelle Inaktivität synaptischer Vesikelproteine Folgen auf die Synaptogenese in der Zellkultur hat, wurde in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Inaktivierung von Synaptophysin und Synaptobrevin durch knock-out (Synaptophysin) bzw. Toxinbehandlung (Synaptobrevin) untersucht.

1.7 Synaptophysin und Synaptobrevin – Proteine synaptischer Vesikel

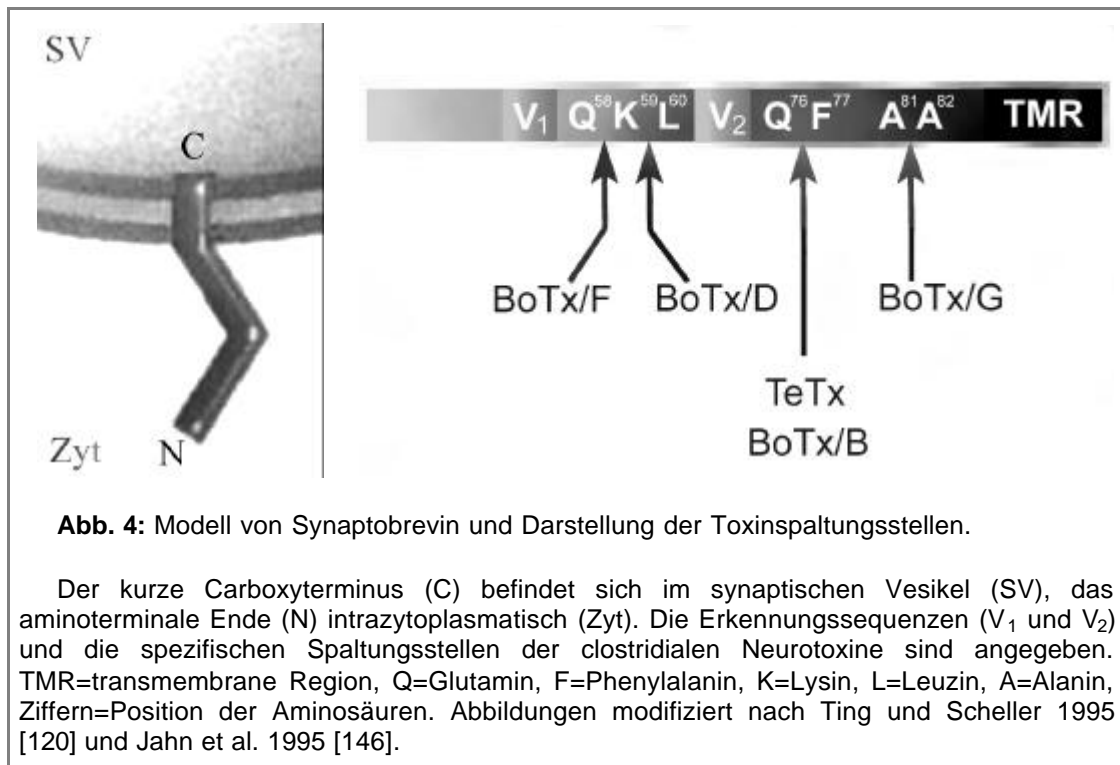
Das Interesse der vorliegenden Arbeit galt vornehmlich den beiden Proteinen Synaptophysin und Synaptobrevin. Synaptophysin ist ein integrales Vesikelprotein mit vier transmembranen Domänen und zytoplasmatisch lokalisierten carboxy- und aminoterminalen Enden [132]. Ein Modell des Proteins ist in der Abb. 3 dargestellt. Synaptophysin wurde 1985 von Jahn et al. [40] und Wiedenmann und Franke [41] entdeckt. Es gehört zu einer Proteinfamilie, der auch Pantophysin und Synaptoporin angehören [53,54]. Seine frühe Expression und die spezifische Lokalisation an synaptischen Vesikeln macht es zu einem Markerprotein der neuronalen Differenzierung [38,50,49,39]. Über seine Funktion wurde bisher viel spekuliert. Rehm et al. vermuteten 1986 Funktionen als Ca^{2+} -Sensor [44], Thomas et al. 1988 eine Wirkung als Kanalprotein [60]. In Synaptophysin-defizienten Mäusen konnten keine morphologischen oder funktionellen Unterschiede zu Wildtypmäusen festgestellt werden [43,55]. Bei der Transmitterfreisetzung ist es daher nicht essentiell, scheint aber über eine Komplexbildung mit Synaptobrevin [61,62,66] dessen Verfügbarkeit für den oben beschriebenen Fusionskomplex zu regulieren [66]. Durch Mitwirkung an Membran-recyclingvorgängen könnte dem Protein eine Rolle bei Wachstumsvorgängen und konstitutiver Exozytose zukommen [49].



In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Synaptophysin bei neuronalen Wachstumsprozessen beteiligt ist. Die Expression und Verteilung des Proteins in der hippocampalen Zellkultur sowie die Auswirkungen des knock-out von Synaptophysin auf Wachstum und Synaptogenese sind Gegenstand dieser Arbeit.

Synaptobrevin wurde 1989 von Baumert et al. in neuronalem Gewebe nachgewiesen, nachdem es Trimble et al. 1988 an Vesikeln von *Torpedo californica* entdeckt hatten [94]. Es wird auch als VAMP bezeichnet (vesicle associated membrane protein) und existiert in den Isoformen I und II. Beide Isoformen weisen im Nervensystem unterschiedliche Lokalisationen auf [80,73].

Die Isoform Cellubrevin findet sich vorwiegend in nicht-neuronalen Zellen [72]. Synaptobrevin ist ein integrales Membranprotein synaptischer Vesikel mit einer ähnlichen Verteilung wie Synaptophysin [70,71]. Südhof et al. analysierten 1989 die Struktur und beschrieben Synaptobrevin als Protein mit 4 Domänen. Die aminotermine Domäne und eine kurze intravesikuläre carboxyterminale Sequenz sind recht variabel, während die zytoplasmatische und die transmembrane Domäne evolutionär hoch konserviert sind [133]. Ein Modell des Proteins zeigt die Abb. 4. Funktionell ist Synaptobrevin an der Bildung des Fusionskomplexes beteiligt, wie oben beschrieben wurde. Synaptobrevin wird durch die clostridialen Neurotoxine Tetanustoxin und Botulinumtoxin B, D, F, und G spezifisch gespalten [74,75,76,77] und dadurch funktionell inaktiviert. Die Toxine hemmen so die Exozytose. Das Protein scheint keine weiteren Funktionen zu haben, da bei Versuchen mit Toxinbehandlung oder genetischen Mutationen keine Unterschiede zu Kontrollkulturen festgestellt werden konnten [71,27,82]. Seine essentielle Rolle bei der regulierten Exozytose stellt eine Beteiligung des Proteins bei konstitutiver Exozytose und Wachstumsprozessen zur Diskussion.



In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Synaptobrevin bei neuronalem Wachstum beteiligt ist. Die Expression und Verteilung des Proteins in der hippocampalen Zell-kultur wurde dargestellt. Die Folgen der funktionellen Inaktivierung von Synaptobrevin durch Tetanustoxin auf das Wachstum von Axonen und Dendriten wurden geprüft.

1.8 Wirkungsweise und Nutzung clostridialer Neurotoxine

Durch ihre Fähigkeit, die neuronale Exozytose zu hemmen, haben sich clostridiale Neurotoxine als wertvolle Hilfsmittel in der Erforschung der synaptischen Transmission erwiesen. *Clostridium tetani* produziert Tetanustoxin (TeTx) und *Clostridium botulinum* insgesamt 7 verschiedene Botulinumtoxine (BoTx, Typen A bis G). Diese Toxine sind die Substanzen mit der höchsten bekannten Toxizität und verursachen die schweren Krankheitsbilder Tetanus (Wundstarrkrampf) und Botulismus (paralytisches Krankheitsbild). Botulinumtoxine werden auch therapeutisch zur Behandlung verschiedener Spastizitätsformen eingesetzt [143]. Die Toxine bestehen aus zwei Ketten, einer H-Kette (heavy chain) mit einer Masse von 100,000 und einer L-Kette (light chain) von 50,000, die durch eine Disulfidbrücke und Ionenbindungen verbunden sind.

Botulinumtoxine sind an Haemagglutinine gebunden und so nach der Aufnahme vergifteter Nahrung vor dem Angriff von Verdauungsenzymen geschützt. Sie werden als intakte Toxine durch Endozytose spezifisch von Nervenzellen aufgenommen. Botulinumtoxine verbleiben in den peripheren Neuronen. Tetanustoxin gelangt über Wunden in den Blutkreislauf und wird ebenfalls spezifisch von Nervenzellen endozytiert. Es gelangt durch retrograden Transport in

inhibitorische Interneurone des Rückenmarks und über exozytotische Prozesse auch in höhere Zentren des ZNS. Für die Transportvorgänge der Toxine ist die H-Kette verantwortlich, während die L-Kette als hochspezialisierte Zn^{2+} -Metalloendoprotease enzymatische Aktivität besitzt und die eigentliche Toxinwirkung verursacht. Dafür muß die L-Kette ins Zytosol gelangen, was möglicherweise über die Bildung einer Pore durch einen Teil der H-Kette und über reduktive Mechanismen geschieht. Eine Übersicht der beschriebenen Toxineigenschaften geben Ahnert-Hilger und Bigalke in [135].

Die Substrate der proteolytischen L-Ketten sind die drei synaptischen Vesikelproteine Syntaxin (BoTx C), SNAP-25 (BoTx A, C und E) und Synaptobrevin (TeTx, BoTx B, D, F und G). Ein Überblick über die Spaltungsstellen der einzelnen Toxine ist in der Tab. 2 dargestellt. Die L-Ketten der Toxine erkennen ihre Substrate über zwei Bindungsstellen: eine Toxinbindungssequenz, die allen drei Proteinen gemeinsam ist (sog. SNARE-Motif), und über die spezifische Spaltungsstelle [137,138]. Ein allosterischer Mechanismus der Toxinwirkung ist daher wahrscheinlich [136]. Die gemeinsame Toxinbindungsstelle kann für die gegenseitige Inhibition der Toxinwirkung bei gleichzeitiger Gabe von z.B. TeTx und BoTx/A sowie für die Kreuzreaktivität einiger Antikörper gegen Syntaxin, SNAP-25 und Synaptobrevin verantwortlich sein [137,136].

Neurotoxin	Zielprotein	Spaltungsstelle	Referenz
BoTx / A	SNAP-25	Gln 197 / Arg 198	Blasi et al. 1993 [139]
BoTx / B	Synaptobrevin	Gln 76 / Phe 77	Schiavo et al. 1992 [74]
BoTx / C	Syntaxin SNAP-25	Lys 253 / Ala 254 carboxy-terminal	Blasi et al. 1993 [140] Williamson 1996 [141]
BoTx / D	Synaptobrevin	Lys 59 / Leu 60	Yamasaki et al. 1994 [75]
BoTx / E	SNAP-25	Arg 180 / Ile 181	Binz 1994 [142]
BoTx / F	Synaptobrevin	Gln 58 / Lys 59	Schiavo et al. 1993 [76]
BoTx / G	Synaptobrevin	Ala 81 / Ala 82	Yamasaki et al. 1994 [77]
TeTx	Synaptobrevin	Gln 76 / Phe 77	Schiavo et al. 1992 [74]

Tab. 2: Clostridiale Neurotoxine und ihre Substrate

Durch diese Spezifität der Toxinwirkung wird die wichtige Rolle der synaptischen Vesikelproteine bei der Exozytose unterstützt. Die Toxine bieten sich als Werkzeuge zur selektiven Inaktivierung einzelner Vesikelproteine an. So können die Folgen der funktionellen Defizienz z.B. in Bezug auf Wachstum und Entwicklung neuronaler Zellen untersucht werden. Neben der Hemmung der Exozytose wurde z.B. für BoTx / A festgestellt, daß es das Axonwachstum inhibiert [28,27], was auf eine Beteiligung von SNAP-25 beim axonalen Wachstum schließen läßt. Ähnliches wurde für BoTx / C und Syntaxin herausgefunden [13,32]. Synaptobrevin scheint dagegen keine Rolle bei neuronalen Wachstumsprozessen zu spielen, da in verschiedenen mit TeTx oder BoTx / B behandelten Kulturen keine Auswirkungen auf die Entwicklung und Synapto-genese gefunden wurden [27,71].

In der vorliegenden Arbeit wurde Tetanustoxin genutzt, um die Auswirkungen der funktionellen Defizienz von Synaptobrevin auf die Entwicklung und Differenzierung der hippocampalen Zellkultur zu untersuchen.

1.9 Die Synaptophysin-knock-out-Maus

Eshkind und Leube entwickelten und beschrieben 1995 eine Synaptophysin-knock-out-Maus [43]. Das komplette Fehlen des Synaptophysin-Gens führte zu keinen sichtbaren Veränderungen von Entwicklung, Verhalten und Mobilität der Maus. Synaptophysin-defiziente Mäuse waren fortpflanzungsfähig und wurden normal alt. Die Gewebe-architektur verschiedener Hirnschnitte wies keine Veränderungen auf und die immun-fluoreszenzmikroskopisch dargestellte Verteilung synaptischer Vesikelproteine glich der in Kontrollmäusen [43]. McMahon et al. (1996) konnten bis auf einen leichten Abfall der Synaptobrevin-2-Konzentration ebenfalls keine Unterschiede zwischen Synaptophysin-defizienter Maus und Kontrollmäusen feststellen. Ca^{2+} -abhängige und Ca^{2+} -unabhängige Transmitterfreisetzung verliefen normal [55]. In Anbetracht der Verteilung des Proteins und seiner spezifischen Lokalisation an synaptischen Vesikeln sind diese Ergebnisse erstaunlich. Wenn auch eine essentielle Bedeutung des Proteins ausgeschlossen werden kann, so sind doch regulierende Funktionen z.B. während des neuronalen Wachstums und der Synaptogenese denkbar.

Die Synaptophysin-defiziente Maus wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um zu untersuchen, ob das Fehlen des Proteins Konsequenzen in Bezug auf das Wachstum neuronaler Fortsätze und die Synaptogenese hat. Eine Synaptophysin-knock-out-Maus wurde freundlicherweise von Prof. R. Leube zur Verfügung gestellt.

2 Ziele der Arbeit

1. Es soll anhand der primär dissoziierten Zellkultur pränataler hippocampaler Neurone der Maus die Verteilung der synaptischen Vesikelproteine Synaptophysin und Synaptobrevin (VAMP-2) während der Entwicklung *in vitro* dargestellt werden.
2. Durch Zugabe von Tetanustoxin zur pränatalen Zellkultur soll geprüft werden, ob die Inaktivierung von Synaptobrevin durch TeTx *in vitro* Konsequenzen in Bezug auf das morphologische Erscheinungsbild der Neurone, die Synapsenbildung und das Wachstumsverhalten hat.
3. Anhand des knock-out von Synaptophysin soll untersucht werden, ob *in vitro* das Fehlen des Proteins Konsequenzen in Bezug auf das Wachstumsverhalten, die Synapsenbildung und das morphologische Erscheinungsbild der Neurone hat.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Chemikalien

3.1.1 Geräte

- Acryl-Küvetten, Fa. Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
- Autoklav, Fa. Gössner, Modell GVA 4,6-3, Hamburg, Deutschland
- Blotkammer, Fa. Hoefer Scientific Instruments, USA
- Brutschrank, Fa. Heraeus, Modell B5060, Hanau, Deutschland
- Elektrophorese-Kammer, Fa. Hoefer Scientific Instruments, USA
- Einmalpipetten, Fa. Falcon, 5, 10, 25 ml, Lincoln Park, USA
- Einmalröhrchen, Fa. Falcon, Blue Max, 50 ml, Lincoln Park, USA
- Einmalröhrchen, Fa. Falcon, 10 ml, Lincoln Park, USA
- Einmalspritzen, Fa. Braun, 10 ml, Melsungen, Deutschland
- Gelrockner, Fa. Biometra, Modell D 61, Göttingen, Deutschland
- Kulturschalen, Fa. Greiner, 36/10 mm, Frickenhausen, Deutschland
- Kulturschalen, Fa. Greiner, 60/15 mm, Frickenhausen, Deutschland
- Kulturschalen, Fa. Nunc, 4well Multidish, Roskilde, Dänemark
- Laborwaagen, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Pasteurpipetten, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Pipettenspitzen, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Mikroskop, Fa. Zeiss, Axiovert 135 mit Fotoausstattung Ricoh KR-10M, Oberkochen, Deutschland
- Mikroskop, Fa. Olympus, BX 50 mit Fotoeinheit PM-20/PM-C 35 DX
- Fluoreszenzfilter, Fa. Olympus, U-MNIBA, U-MWIG, Mischfilter U-M51004
- pH-Meter, Fa. WTW, Modell 537, Weilheim, Deutschland
- Photometer, Fa. Milton Roy, Modell Spectronic 601, Rochester, USA
- Pipettierhilfe, Fa. Hirschmann, Modell Pipetus-Akku, Eberstadt, Deutschland
- Pipettierhilfen, Fa. Gilson, Modell Pipetman P, Villiers-le-Bel, Frankreich
- Schlauchpumpe, Fa. ABIMED, Modell Minipuls 2, Langenfeld, Deutschland
- Schüttelwasserbad, Fa. GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Modell 1083, Burgwedel, Deutschland
- Schüttler, Fa. IKA-Labortechnik, Modell MTS 4, Staufen, Deutschland
- Stereolupe, Fa. Zeiss, Modell SV 11, Oberkochen, Deutschland
- Sterilfilter 150 ml, Fa. Nalgene, Modell 1550020, Hereford, U.K.
- Sterilfilter 500 ml, Fa. Nalgene, Modell 1564020, Hereford, U.K.
- Sterilfilter aufsteckbar, Fa. Schleicher & Schuell, FP 030/3, Dassel, Deutschland
- Tischzentrifuge, Fa. Hettich, Modell Universal, Tuttlingen, Deutschland
- Transelektronenmikroskop, Fa. Zeiss, Modell EM 900, Oberkochen, Deutschland
- Trockenheiluftsterilisator, VEB MLW Medizinische Geräte, Modell 113-0100, Berlin, Deutschland
- Ultraschallbad, Fa. Branson, Modell 1200, Soest, Niederlande
- Ultraschall-Homogenisator, Fa. Bandelin, Berlin, Deutschland
- Ultrotom, Fa. Reichert, Modell Ultracut S, Wien, Österreich
- Vibratom, Fa. Pelco, Serie 1000, Redding, USA

- Vortex, Fa. IKA-Labortechnik, Modell G560E, Staufen, Deutschland
- Wärmeschrank, VEB MLW Medizinische Geräte, Berlin, Deutschland

3.1.2 Chemikalien

- ABC-Peroxidase-Kit, Fa. Vector, Burlingame, USA
- Albumin, bovine, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- anti-mouse-IgG, goldmarkiert, Auro Probe One GAR, Fa. Amersham
- anti-rabbit-IgG, goldmarkiert, Auro Probe One GAR, Fa. Amersham
- DAB (Diaminobenzidin), Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Dinatriumhydrogenphosphat, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- EDTA (Ethylen-dinitrilo-tetra-Essigsäure-di-Natrium-Dihydrat), Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Entellan, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Epon 812, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Epon Accelerator DMP30, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Epon Hardener DDSA, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Epon Hardener MNA, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Ethanol, Fa. Baker, Deventer, Holland
- FITC (Flourescein-Isothiocyanate)-anti rabbit made in goat (IgG, H+L), Fa. Vector, Burlingame, USA
- Glutaraldehyd 70%, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glycin, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- goat-anti-rabbit, biotinyliert (IgG, H+L), Fa. Vector, Burlingame, USA
- HEPES, Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland
- horse-anti-mouse, biotinyliert (IgG, H+L), Fa. Vector, Burlingame, USA
- HPMA (Hydroxypropylmethacrylate), Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- HRP (Horseradish peroxidase) type II, 200 U/mg, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Immuno-Mount, Fa. Shandon, Cheshire, GB
- Kaisers-Glycerin-Gelatine, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Längenmarker für die Elektrophorese, Fa. Pharmacia, Freiburg, Deutschland
- Methanol, Fa. Baker, Deventer, Holland
- monoclonal anti-GFAP made in mouse, Fa. ICN, Meckenheim, Deutschland
- monoclonal anti-rab3A made in mouse, clone 42.2, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. Jahn
- monoclonal anti-SNAP-25 made in mouse, Fa. Sternberger, Baltimore, USA
- monoclonal anti-Synaptobrevin made in mouse, clone 69.1, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. Jahn
- monoclonal anti-Synaptophysin made in mouse, Fa. Progen, Heidelberg, Deutschland
- monoclonal anti-Syntaxin made in mouse, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Natriumazid, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumcacodylat, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- Natriumchlorid, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- Natriumcitrat, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumdihydrogenphosphat, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland

- Natriumhydroxid, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Nitrozellulose-Membran, Fa. Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
- Osmiumtetroxid (%), Fa. Plano, Marburg, Deutschland
- Paraformaldehyd, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Pferdeserum (für die Zellkultur), Fa. Gibco, Eggenstein, Deutschland
- Pferdeserum, Fa. Vector, Burlingame, USA
- polyclonal anti-Synapsin made in rabbit, Fa. Calbiochem, San Diego, USA
- polyclonal anti-Synaptophysin made in rabbit, Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland
- polyclonal anti-Synaptoporin made in rabbit, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von H. Betz
- Poly-D-Lysin, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfate), Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland
- Silberverstärker Inten SE M, Amersham
- Steriles Wasser, Tissue culture tested, Fa. Gibco, Eggenstein, Deutschland
- Texasrot-Avidin D, Fa. Vector, Burlingame, USA
- Trichloressigsäure, Fa. Merck, Deutschland
- Tris-HCl, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Tris-Hydroxymethylaminomethan, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Triton-X 100, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Uranylacetat, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Xylol, Fa. Baker, Deventer, Holland
- Ziegenserum, Fa. Vector, Burlingame, USA

3.1.3 Lösungen und Medien für die Zellkultur

- Na-Selenit-Stammlös.: 10,4 mg Na-Selenit in 10 ml PBS, davon 100 µl in 10 ml PBS
- Insulin-Stammlösung: 250 mg Insulin in 10 ml HCl (20 mM)
- T3-Stammlösung: 2mg T3 in 100 ml NaOH (10 mM)
- BSA-Stammlösung: 2g BSA in 20 ml PBS, pH 7,0 (= BSA_{hi}); davon 1 ml in 9 ml PBS (= BSA_{lo})
- Aprotinin-Stammlösung: 10 mg Aprotinin in 10 ml PBS
- Transferrin-Stammlösung: 500 mg Transferrin in 5 ml PBS
- Hormon-Cocktail (aus den oben genannten Stammlösungen angesetzt): 2 ml BSA_{lo}, 2 ml Transferrin-Stammlösung, 2 ml Aprotinin-Stammlösung, 1 ml Na-Selenit-Stammlösung, 20 µl T3-Stammlösung, 800 µl Insulin-Stammlösung in 12,2 ml PBS
- Kulturmedium: 1 ml BSA_{hi}, 1 ml Hormon-Cocktail, 250 mg Glucose (Anhydrat), 1 ml Na-Pyruvat in 100 ml BME mit Glutamax-I, pH 7,2
- Hanks'sche Salzlösung (modifiziert): 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄*2H₂O, 5 mM Glucosemonohydrat, 2,5 mM CaCl₂*2H₂O, 1,2 mM MgSO₄*7H₂O, 4,17 mM NaHCO₃ in Aqua bidest., pH 7,2
- Zell-Ablösepuffer: 15 mM NaCl, 1 mM PIPES, 0,1 mM EDTA in Aqua bidest., pH 7,2

3.1.4 Lösungen zur immunhistochemischen Gewebeaufbereitung

- Acetat-Puffer-Stock: 68,05 g NaAc in 500 ml Aqua bidest, pH=5,6 mit Eisessig eingestellt
- Acetat-Waschpuffer: 1,5 ml Acetat-Puffer-Stock + 8,5 ml Aqua bidest
- AKV (Antikörperverdünner): 0,5% BSA und 0,05% NaN₃ in PBS, pH=7,3
- BSA-C-Stock: 2 g carboxymethylated BSA in 20 ml Aqua bidest
- Cacodylatpuffer: 42,8 g in 1 l Aqua bidest, pH=7,2

- DAB-Stammlösung: 2,5 g DAB in 1 l Aqua bidest, bei -20°C 1 Jahr haltbar
- Goldchlorid-Stock: 0,1 g HAuCl_4 in 1 ml Aqua bidest
- HEPES-Stock: 4,76 g HEPES + 19 ml Aqua bidest, $\text{pH}=7,4$ mit 10 M NaOH eingestellt; HEPES-Waschpuffer: 3 ml HEPES-Stock + 7 ml Aqua bidest
- Natriumthiosulfatpuffer: 1,25 g NaS_2O_3 + 50 ml Aqua bidest + 1 ml HEPES-Stock
- Paraformaldehyd (4%): 4g Paraformaldehyd in 100 ml Aqua bidest, $\text{pH}=7,2$, frisch ansetzen
- PBS (0,01 M): 2,8 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und 7,2 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in Aqua bidest, $\text{pH} = 7,2$, bei RT 2 Monate haltbar
- PBS-A-Stock: 400 mg bovine serum albumin (BSA) in 20 ml PBS
- Phosphatpuffer (0,1 M): 33 mM NaH_2PO_4 und 67 mM Na_2HPO_4 in Aq. bidest, $\text{pH} = 7,4$, bei RT 2 Monate haltbar
- Tween-20-Stock: 2 g Tween in 20 ml Aqua bidest

3.2 Versuchstiere

Zur Gewebebegewinnung und zum Anlegen von Primärkulturen wurden embryonale Mäuse genau bekannten Alters benötigt. Dazu wurden weibliche C57Bl/6J-Mäuse mit männlichen C3H/He-Mäusen (Fa. Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland) für 12 h verpaart. Die Betreuung der Tiere erfolgte im zentralen Tierversuchsstall und im Tierstall des anatomischen Instituts der Charité, wobei die Zucht und alle weiteren Arbeiten mit den Mäusen entsprechend den geltenden Tierschutzbestimmungen durchgeführt wurden.

Die Synaptophysin-knock-out-Maus und die entsprechende Wildtypmaus wurden von Prof. Dr. Rudolf Leube (Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt (Beschreibung in Eshkind und Leube, 1995 [43]).

3.3 Methoden

3.3.1 Gewinnung der Zellkultur

Nach Betäubung mit Narkoseether und Tötung der schwangeren Mäuse durch zervikale Dislokation wurde der Uterus präpariert und die Embryonen entnommen. Die Dekapitation erfolgte mit einer gebogenen Schere direkt unterhalb des Kinns. Für die weitere Präparation unter der Stereolupe (6fache Vergrößerung) wurde der Kopf in eine mit Hanks'scher Lösung gefüllte Petrischale auf Eis gelegt. Die Präparationsschritte erfolgten in PBS, die Sammlung der Präparate in Hanks'scher Lösung auf Eis. Nach Herausnahme des gesamten Hirns in eine gesonderte Petrischale wurde für die Präparation von Tel- und Diencephalon bei 12facher Vergrößerung gearbeitet. Anschließend erfolgte die Entnahme des Hippocampus beider Hemisphären bei 16facher Vergrößerung.

Die nun folgenden Arbeitsschritte wurden in der Sterilwerkbank durchgeführt. Alle Lösungen und Medien wurden auf 37°C im Wasserbad temperiert. Nach Absaugen der Hanks'schen Lösung wurden die Hippocampi mit einer gebogenen Pinzette mechanisch zerkleinert und anschließend durch ein steriles Netz mit einer Porengröße von $200\text{ }\mu\text{m}$ filtriert. Das Filtrat wurde in einer Tischzentrifuge für 9 min bei 1500 U/min zentrifugiert und der Überstand anschließend dekantiert. Die Resuspension des Pellets erfolgte mit Kulturmedium. Danach wurde die Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung und Auszählen in einem Hämozytometer bestimmt und die Verdünnung der Zellen mit Medium auf eine Konzentration von 1 Million Zellen pro 1 ml Medium vorgenommen. Dieser Zelllösung wurde Pferdeserum in der Endkonzentration 1% zugesetzt. Die Aussaat der Zellen erfolgte in Kulturschälchen mit 4 well je 2 cm^2 und einer Dicke von 1 mm. Deren Oberfläche wurde vorher zur Verbesserung des Anheftungs- und Überlebensverhaltens der Zellen mit steriler 2%iger Poly-L-Lysin-Lösung für 24 h bei RT behandelt (gecoatet), anschließend mit Aqua bidest gespült und in der Sterilwerkbank bei RT getrocknet. Bei einem Teil der Versuche erfolgte die Aussaat auf gecoatete Deckgläschen, die in Kulturschälchen mit 6 well aufbewahrt wurden. Die Dichte der Zellaussaat betrug ca. $200\text{ }000/\text{cm}^2$, für die morphometrischen Messungen wurde eine Zelldichte von etwa $5000/\text{cm}^2$ genutzt. Die hippocampale Zellkultur wurde nun bei 37°C und 10 % CO_2 in einem Brutschrank inkubiert. Nach 48 h in Kultur (2 DIV = 2 days *in vitro*) wurde das Medium komplett durch frisches Medium ohne Zusatz von Pferdeserum ersetzt. Im weiteren Verlauf erfolgte die Fütterung der Zellen

wöchentlich, wobei jeweils die Hälfte des Mediums durch frisches Medium ohne Serumzusatz ersetzt wurde.

3.3.2 Lichtmikroskopischer Nachweis der Proteine

Das Prinzip beruht auf der Sichtbarmachung der spezifischen Bindung des Erstantikörpers an sein Antigen. Dies geschieht entweder mit einem biotinylierten Sekundärantikörper, an den über ein Avidin-Biotin-System ein chromogenes Enzym gekoppelt wird, oder mit einem direkt an einen Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelten Zweitantikörper.

3.3.3 Immunzytochemie für Zellkulturen (Avidin-Biotin-Methode)

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd für 30 min fixiert. Anschließend wurde bei RT 3 mal für je 3 min mit PBS gewaschen. Da als Chromogen Peroxidase verwendet wurde, mußte zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse die endogene Peroxidase der Zellen geblockt werden. Das geschah für 5 min bei RT mit einer Lösung aus 10% Methanol und 0,1% H₂O₂ in PBS. Nach 3maligem Waschen in PBS wurden dann die Zellmembranen mit 0,3% Triton-TX in PBS bei RT permeabilisiert, um den Antikörpern den Zugang zu intrazellulär gelegenen Antigenen zu ermöglichen. Danach wurde erneut 3 mal in PBS gewaschen.

Um unspezifische Antigenbindungen des Zweitantikörpers und damit ein falsch-positives Ergebnis zu verhindern, erfolgte die Inkubation der kultivierten Neurone für 30 min bei RT in 2% Normalserum der Spezies, in der der Sekundärantikörper hergestellt wurde. Umgehend erfolgte dann die Zugabe des Primärantikörpers (Eigenschaften und Arbeitskonzentrationen siehe Tab. 3) und Inkubation für 24 h bei 4°C in einer feuchten Kammer. Nach Auswaschung mit PBS wurde der Sekundär-antikörper hinzugegeben (Eigenschaften und Konzentrationen siehe Tab. 4) und für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde dann für 1 h bei RT der Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain ABC-Peroxidase-Kit, 1:100 in PBS nach Anleitung) hinzugegeben. Das anschließende Waschen erfolgte mit TrisHCl. Zur Einleitung der chromogenen Enzymreaktion wurden die Zellen mit einer Lösung aus 0,05% DAB (Diaminobenzidin) und 0,03% H₂O₂ in TrisHCl inkubiert. Die Inkubationszeit richtete sich nach der Stärke der Immunreaktion, die unter dem Mikroskop kontrolliert wurde. Die Reaktion wurde durch Spülen mit PBS gestoppt. Um das mikroskopische Präparat fertigzustellen, wurden die Kulturplatten nach einmaliger kurzer Spülung in Aqua bidest und anschließender Lufttrocknung aus dem Kulturschälchen ausgebohrt und mit Kaisers-Glyzerin-Gelatine auf vorgefertigte Objektträger aufgebracht.

Antikörper	Eigenschaft / Herkunft	Verdünnung
anti-Synaptophysin	polyklonal, Kaninchen	1:1000
	monoklonal, clone SY38, Maus	1:20
anti-Synaptobrevin	monoklonal, clone 69.1, Maus	1:500
anti-Synapsin	polyklonal, Kaninchen	1:500
anti-Synaptoporin	polyklonal, Kaninchen	1:200
anti-rab3A	monoklonal, clone 42.2, Maus	1:1000
anti-GFAP	monoklonal, clone GA5, Maus	1:1000

Tab. 3: Liste der verwendeten Primärantikörper, deren Eigenschaften und Arbeitskonzentration

Antikörper	Eigenschaft / Herkunft	Verdünnung
Biotinyl. anti-Maus	Pferd	1:200
Biotinyl. anti-Kaninchen	Ziege	1:200
FITC	chromogen, Ziege-anti-Kaninchen	1:750

Tab. 4: Liste der verwendeten Sekundärantikörper, deren Eigenschaften und Arbeitskonzentration

3.3.4 Fluoreszenz-Methode

Diese Methode unterscheidet sich von der oben erörterten durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zur Erkennung des Primärantikörpers. Zum einen wurde ein direkt Fluorescein-markierter Sekundärantikörper genutzt (FITC-anti-rabbit), zum anderen wurde über einen Biotin-konjugierten Zweitantikörper (biotinyl. anti-Maus) TexasRot-markiertes Avidin zur Visualisierung verwendet. Das im obigen Arbeitsablauf enthaltene Blocken der endogenen Peroxidase entfällt hierbei. Die nötigen Inkubationen erfolgten in einer abgedunkelten feuchten Kammer, die Arbeitskonzentrationen der entsprechenden Antikörper sind den Tab. 4 zu entnehmen.

Durch Ausnutzung der Herkunft des Erstantikörpers (Maus oder Kaninchen) ist bei dieser Methode eine Doppelmarkierung möglich. Monoklonale Antikörper (Maus) wurden über einen biotinylierten Zweitantikörper (anti-Maus) mit TexasRot-markiertem Avidin dargestellt und für polyklonale Erstantikörper (Kaninchen) wurde der Fluorescein-markierte anti-Kaninchen-Antikörper (FITC = Fluorescein-Isothiozyanat) genutzt. Durch Anregung mit unterschiedlichen Wellenlängen (TexasRot: Emmission bei 615 nm und Extinktion bei 595 nm; FITC: Emmission bei 512 nm und Extinktion bei 492 nm) war somit die spätere Auswertung möglich. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß die Gabe des Sekundärantikörpers alleine (ohne Primärantikörper) lediglich eine schwache diffuse Hintergrundfärbung hervorruft, also eine Beeinflussung der Ergebnisse ausgeschlossen ist.

3.3.5 Elektronenmikroskopischer Nachweis (Preembedding-Methode)

Zur Darstellung der Ultrastrukturen mittels Transmissionselektronenmikroskopie wurde die Preembedding-Methode nach R.W.Veh genutzt. Dabei erfolgte die Fixierung der Neurone in den Zellkulturschalen durch 1,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer für 1 h bei RT. Die endogene Peroxidase wurde wie weiter oben beschrieben geblockt, anschließend erfolgte eine 10minütige Permeabilisierung in 0,5 mg Saponin/ml HBSS. Die Vorinkubation fand in 2% Ziegenserum statt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils 3 mal in PBS gewaschen. Nach der einstündigen Vorinkubation blieb die sogleich zugegebene Lösung des Primärantikörpers (Eigenschaften und Konzentrationen siehe Tab. 3) für 24 h bei 4°C auf den Zellkulturen. Vor Zugabe des Sekundärantikörpers wurde wiederum in PBS gewaschen und 30 min in einer 10% PBS-A-Lösung vorinkubiert.

Die Verdünnung des zur Sichtbarmachung mit 1 nm großen Goldpartikeln markierten Zweitantikörpers (goldmarkiert Ziege-anti-Kaninchen oder Ziege-anti-Maus) erfolgte 1:50 in einer Lösung aus BSA-C, Tween20 und 10%Natriumazid (je 1:100) in PBS. Nach der Inkubation für 24 h bei 4°C wurde in 0,05% PBS-Tween (20 min und 40 min) und PBS (60 min) gewaschen und anschließend mit 2% Glutaraldehyd für 15 min nachfixiert. Sodann folgten dreimal Spülungen mit PBS und sechsmal mit 150 mM NaNO₃. Zur spezifischen Kontrasterhöhung wurde jetzt für 30-60 min unter Sichtkontrolle ein Silberverstärker (Inten SE M, Fa. Amersham) nach Anleitung dazu-gegeben und bei genügender Kontrastierung der Abbruch mit 150 mM NaNO₃ erzeugt.

Die folgenden Schritte fanden bei 4°C in einer Kühlkammer statt. Zunächst wurde mit 5 mM Goldchlorid in Acetat-Waschpuffer inkubiert, dann mit Acetat-Waschpuffer für 5 min und Natriumthiosulfat-Puffer für 15 min gewaschen. Dem folgten Spülungen mit HEPES-Waschpuffer und PBS. Wiederum bei RT erfolgte nun die unspezifische Nachkontrastierung mit 1% OsO₄, dessen membranfestigende Eigenschaft gleichzeitig zur Aushärtung der Zellen nutzbar war. Nach 25 min wurde je dreimal in 50% und 70% Alkohol gewaschen, dann mit 2%

Uranylacetat für 10 min bei 4°C behandelt und anschließend mit 70% Alkohol gespült. Der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe folgte nunmehr die Einbettung in vier Schritten mit steigender Epon 812 – Konzentration. Für je 15 min wurden Mischungen aus 2 Volumenteilen (VT) HPMA + 1VT Epon, dann je 1 VT HPMA und Epon und zuletzt 1 VT HPMA + 2 VT auf die Kulturen gegeben. Abschließend erfolgte die Inkubation mit reinem Epon für 5 min.

Zur Polymerisation wurden dann 6 Tropfen Epon hinzugegeben und bei 60°C ausgehärtet. Zur Ablösung der Kunstharzplättchen mitsamt der Zellen und Fortsätze war es nötig, die Präparate mittels eines entsprechenden Bohrers herauszubohren und nachfolgend das Kunstharz vom Schalenboden mit einem Skalpell abzusprengen. Die Zellen befanden sich nunmehr auf der Oberfläche des Kunstharzplättchens, das damit nach erneuter Aushärtung mit Sekundenkleber auf einen Eponblöckchen geklebt werden konnte. Nach Trimmen mit einer Rasierklinge wurden an einem Ultramikrotom Semi- und Ultra-Dünnschnitte angefertigt, die auf Zaponlack-befilmte Nickelgrids aufgezogen wurden. Anschließend erfolgte eine Nachkontrastierung für 3 min mit Natriumcitrat-Lösung, dann weitere 3 min mit Uranylacetat-Lösung.

3.3.6 Fotografische Dokumentation

Die kultivierten Zellen wurden lichtmikroskopisch mit Hilfe eines Invertmikroskops (Axioplans, Fa. Zeiss) ausgewertet. Der Dokumentation der Ergebnisse diente der integrierte Fotoaufsatz (Ricoh). Die unterschiedlichen der Markierung von Proteinen dienenden immunhisto- und immunzytochemischen Chromogene erforderten die Verwendung verschiedener Filme und Mikroskopeinstellungen. Für die über die Peroxidasereaktion visualisierten Zellkulturen erfolgte die Darstellung mit und ohne Phasenkontrast auf Pan Ilford – Filmen (schwarz / weiss Negativfilm, 50 ASA). Fluoreszenzpräparate wurden an dem Mikroskop BX50 der Firma Olympus mit der Fotosteereinheit PM-20 und dem Apparat PM-C 35 DX fotografiert. Die Anregung der Farbstoffe erfolgte mit einer Quecksilberdampf Lampe und den Olympus-Filtern U-MNIBA (Anregung von 470-490 nm, dichroitische Teilung bei 505 nm, Sperrfilter von 515-550 nm) für FITC und U-MWIG (Anregung von 520-550 nm, dichroitische Teilung bei 565 nm, Sperrfilter von > 580 nm) für CY-3. Für die gleichzeitige Anregung beider Fluoreszenzfarbstoffe wurde das Mischfilter U-M51004 (Anregung von 480-495 nm sowie 550-570 nm, Sperrfilter von 515-535 nm und 590-620 nm) genutzt. Fotografiert wurde auf Kodak Elite - Film (Diafilm, 1600 ASA). Die ultrastrukturellen Aufnahmen wurden an einem Transelektronenmikroskop (EM 900) der Firma Zeiss gemacht.

3.3.7 Morphometrische Messungen

Zur Ermittlung von Axon- und Dendritenlängen wurde das halbautomatische Bildanalysesystem „Videoplan“ der Firma KONTRON-Elektronik (Eching, Deutschland) genutzt. An nach Doppel-Blind-Design ausgewählten Phasenkontrastbildern von mit MAP2 gefärbten Kulturen konnten Dendritenanzahl, Anzahl der Dendriten- und Axonverzweigungen sowie die Längen der jeweiligen Fortsätze gemessen werden. Die so erhaltenen Daten wurden in MS Excel aufbereitet und anschließend statistisch ausgewertet. Für die Stichprobenvergleiche wurde der U-Test nach Mann und Whitney bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ (signifikanter Unterschied) bzw. $p < 0,01$ (hochsignifikanter Unterschied) verwendet.

3.3.8 Nachweis von Proteinen mittels Westernblot

Für den immunpräzipitativen Nachweis der synaptischen Vesikelproteine in pränatalen hippocampalen Neuronen wurden Proben auf zwei Arten gewonnen. Zum einen wurde Zellmaterial direkt aus Homogenisaten des präparierten Hippocampus genutzt. Die Hippocampi prä- und postnataler Mäuse wurden dazu wie beschrieben entnommen und umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Untersuchung von Zellen verschiedener Entwicklungsstadien *in vitro* wurden Homogenisate der in der Zellkultur kultivierten Neurone verwendet. Nach Inkubation in Zellablösepuffer wurden die kultivierten Neurone vom Boden des Kulturschälchens abgelöst und anschließend für 3 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Das somit gesammelte Zellmaterial wurde dann ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für eine Probe wurden typischerweise 12 Mio ausgesäte und kultivierte Zellen eingesetzt. Für die weitere Verarbeitung wurde das Zellmaterial aufgetaut und nach Aufnahme in Probenladepuffer erst mechanisch und dann mittels Ultraschall homogenisiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation des Homogenats für 5 min bei 100°C im Wasserbad. Partikel, die noch ungelöst waren, wurden durch erneutes Zentrifugieren bei 4.000U/min entfernt. Aus dem die Proteine

enthaltenden Überstand wurde eine Probe zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration entnommen. Hierbei diente BSA als Standard. Der restliche Überstand wurde mit einer Spur Bromphenolblau versetzt und dann nochmals 5 min bei 100°C im Wasserbad inkubiert.

Durch Zugabe von Probenladepuffer erfolgte die endgültige Einstellung der Proteinkonzentration auf 20 µg/µl. Pro Geltasche wurden jeweils 10 µl dieser Proben aufgetragen und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in der Midget-Kammer aufgetrennt. Dazu wurden Gele von 7,5 %-10 % verwandt. Die aufgetrennten Proteine wurden dann mit Hilfe des Westernblot-Verfahrens auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Für die Detektierung der Proteine auf der Nitrocellulose-Membran unter Verwendung der ABC-Technik kamen spezifische Primärantikörper zur Anwendung, die in der folgenden Tabelle aufgeführt sind.

Antikörper	Eigenschaft / Herkunft	Verdünnung
anti-Synaptophysin	polyklonal, Kaninchen	1:2000
anti-Synaptobrevin	monoklonal, clone 69.1, Maus	1:3000
anti-Synaptoporin	polyklonal, Kaninchen	1:500
anti-Syntaxin	monoklonal, clone HPC-1, Maus	1:2000
anti-SNAP-25	monoklonal, Maus	1:3000

Tab. 5: Eigenschaften und Arbeitskonzentrationen der Primärantikörper beim Western-Blot-Verfahren

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der hippocampalen Zellkultur durch licht- und elektronenmikroskopische Darstellungen

4.1.1 Zelltypen, Zellwachstum und Zelldichte

In der primär dissoziierten hippocampalen Zellkultur kommen neben nicht neuronalen Zellen, wie Bindegewebs- und Gliazellen, hauptsächlich zwei neuronale Zelltypen vor: pyramidale Neurone und Körnerzellen. Pyramiden- und Körnerzellen sind aufgrund von Größe und Form zu unterscheiden.

Die Vereinzelung der Zellen (Dissoziation des Gewebes) erfolgte mechanisch durch vorsichtiges Pipettieren. Dabei reißen alle Zellfortsätze ab und die Zellen sind bei der Aussaat fortsatzlos und abgerundet. Die Stadieneinteilung der neuronalen Entwicklung nach der Dissoziation, die in der hippocampalen Zellkultur beobachtet wurde, orientiert sich an der Einteilung von Dotti 1988 [2]. Die intakten Perikarya beginnen nach der Aussaat erst Lamellipodien (Stadium 1) und dann neue Fortsätze (Stadium 2) zu bilden. Von den kleinen Fortsätzen differenziert sich einer nach einigen Stunden bis zu 1 DIV (DIV=days *in vitro*, Tage *in vitro*) zum Axon (Stadium 3). Die Axone, an deren Enden sich oft Wachstumskegel, die sogenannten growth cones, als Auftreibungen befinden, wachsen in den ersten Tagen schneller als die Dendriten. Diese entwickeln sich erst nach dem 3.Tag in Kultur schneller (Stadium 4). In späteren Stadien bilden die Dendriten und Axone ein weit verzweigtes Fasernetz (Stadium 5).

Erstaunlicherweise ist die morphologische Form, durch die sich Körner- und Pyramidenzellen unterscheiden lassen, schon nach 1 DIV nachweisbar (Abb. 5) und gehört offenbar zum intrinsischen Programm dieser Zellen. Die runden bis ovalen Körnerzellen haben runde Zellkörper, deren Durchmesser in den Anfangsstadien der Zellkultur bei 5–8 µm liegt. Aufgrund ihres unterschiedlichen Verzweigungsgrades lassen sich zwei Typen von Körnerzellen differenzieren. Der erste Typ weist neben einem langen Axon nur 1 bis 2 kurze primäre Dendriten auf (unverzweigter Typ G/1, Abb. 6), der andere Typ zeigt dagegen 3 bis 5 längere und oft verzweigte primäre Dendriten (verzweigter Typ G/2, Abb. 7). Die Pyramidenzellen haben dreieckige, anfangs 8–12 µm große Perikarya und außer ihrem Axon 4 bis 7 abzweigende Dendriten (Abb. 8). Nach 6 DIV ist zu beobachten, daß sich die Differenzierung in zwei Körnerzelltypen und Pyramidenneurone erhalten hat, wie die Abb.9, 10 und 11 erkennen lassen. In älteren Kulturen werden Pyramiden- und Körnerzellen größer und sind in ihren Durchmessern denen *in vivo* vergleichbar. Abb.12 und 13 zeigen Beispiele für 18 DIV.

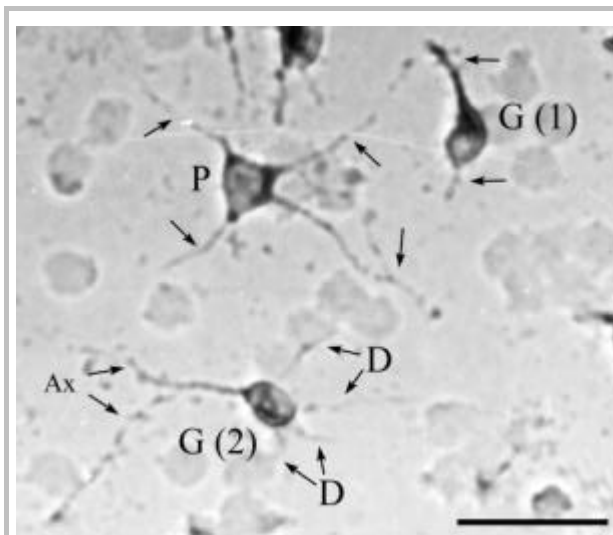


Abb. 5: Phasenkontrastbild nach 1DIV. Dargestellt sind nach 1 DIV die drei verschiedenen neuronalen Zelltypen der hippocampalen Zellkultur: G(1)=Körnerzelle vom unverzweigten Typ, G(2)=Körnerzelle vom verzweigten Typ, P=Pyramidenzelle. Die Pfeile zeigen auf die Zellfortsätze: Ax=Axon, D=Dendriten. Maßstab = 30 µm

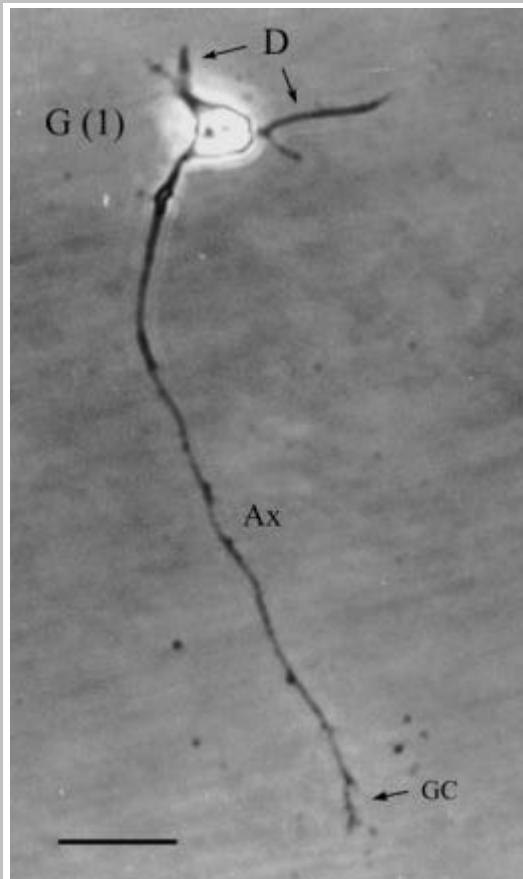


Abb. 6: Phasenkontrastbild einer Körnerzelle (G/1) vom unverzweigten Typ nach 2 DIV. Ax = Axon, Dendr = Dendriten, GC=growth cone. Maßstab = 20 μ m

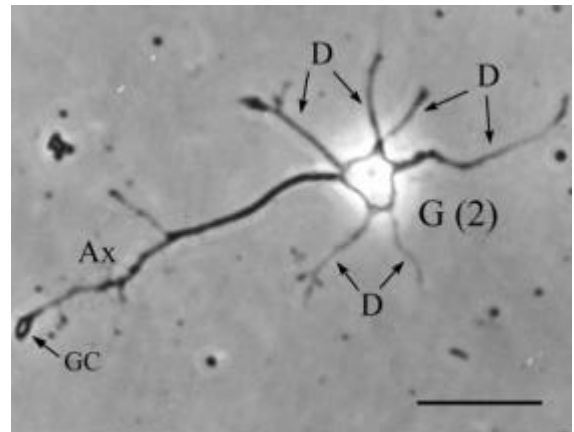


Abb. 7: Phasenkontrastbild einer Körnerzelle (G/2) vom verzweigten Typ nach 2 DIV. Ax=Axon, D=Dendriten, GC=growth cone, Maßstab =20 μ m

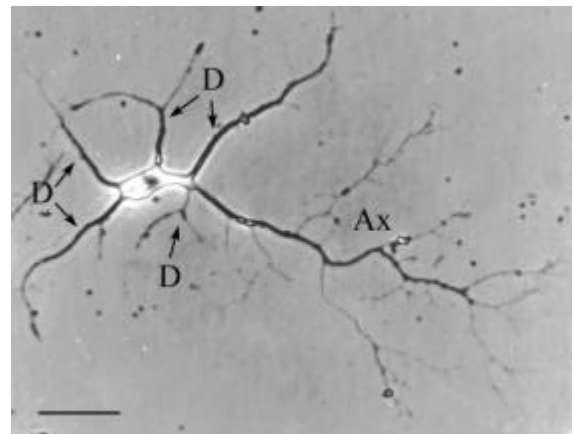


Abb. 8: Phasenkontrastbild einer Pyramidenzelle nach 2 DIV. Ax=Axon, D=Dendriten. Maßstab =15 μ m

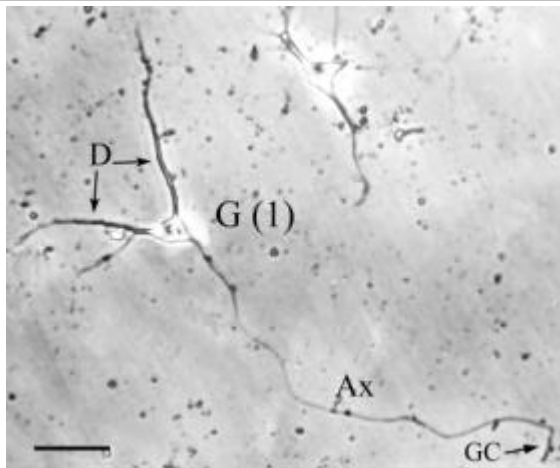


Abb. 9: Phasenkontrastbild einer Körnerzelle (G/1) vom unverzweigten Typ nach 6 DIV; Ax=Axon, D=Dendriten, GC=growth cone, Maßstab = 15 μ m

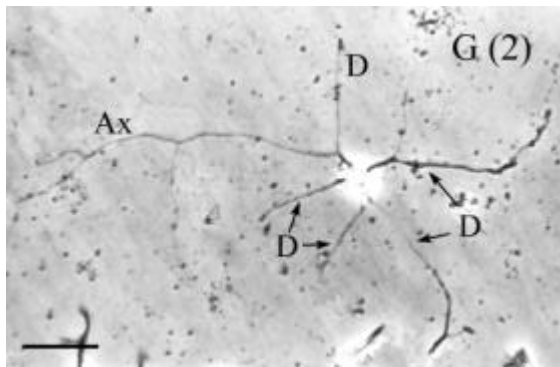


Abb. 10: Phasenkontrastbild einer Körnerzelle (G/2) vom verzweigten Typ nach 6 DIV; Ax=Axon, D=Dendriten, Maßstab = 15 μ m

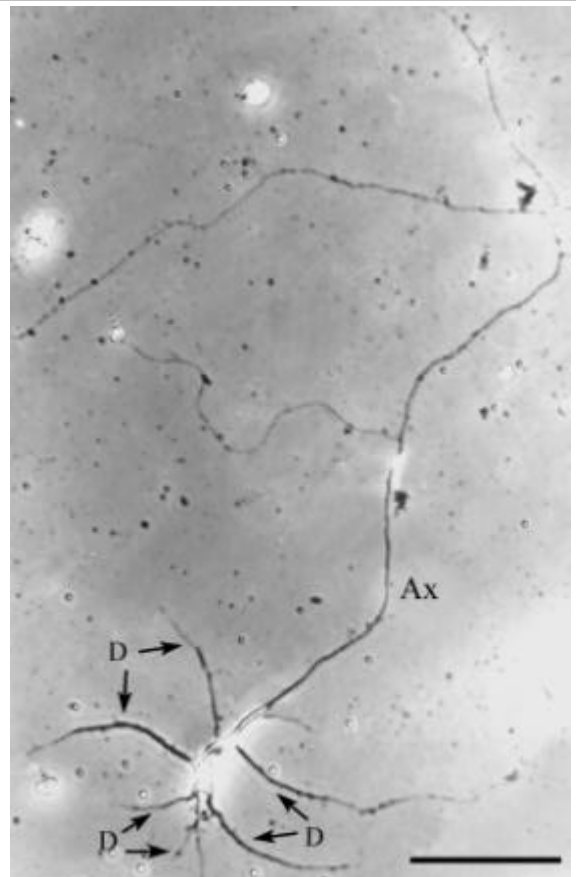


Abb. 11: Phasenkontrastbild einer Pyramidenzelle nach 6 DIV; Ax=Axon, D=Dendriten, Maßstab = 30 μ m

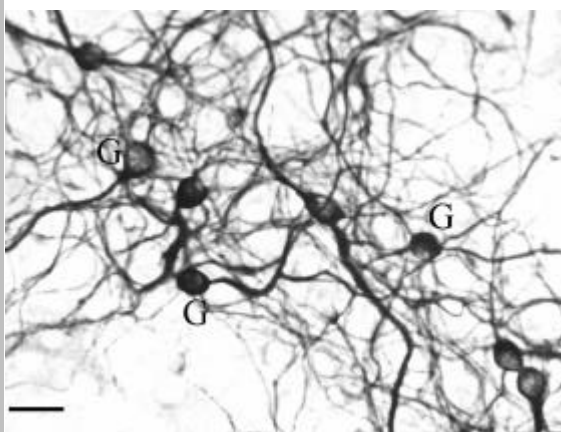


Abb. 12: Mehrere typische Körnerzellen (G) nach 18 DIV; Markierung mit anti-MAP2 (dendritischer Marker), DAB-Entwicklung, Maßstab = 15 μ m

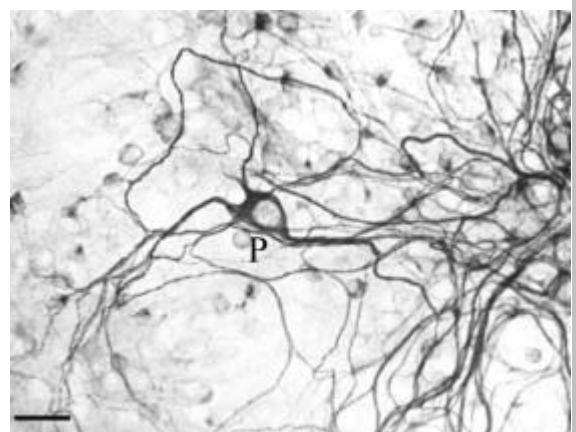


Abb. 13: Pyramidenzelle nach 18 DIV; Markierung mit anti-MAP2, DAB-Entwicklung, Maßstab=15 μ m

Weitere Parameter, anhand derer sich Pyramidenzellen und Körnerzellen eindeutig

unterscheiden lassen, sind in Tab. 6 aufgeführt. Nach 6 DIV wurden die Fläche, der Umfang sowie maximaler und minimaler Zelldurchmesser gemessen. Die Fläche der Pyramidenneurone erweist sich etwa doppelt so groß wie die der Körnerzellen, der Zellumfang beträgt das anderthalbfache. Maximaler und minimaler Zelldurchmesser sind bei Pyramidenzellen etwa 50 % größer als bei Körnerzellen. Die mit dem „Videoplan“-System der Firma Kontron (Eching, Deutschland) gesammelten und ausgewerteten Daten sind in der Tab. 6 als Mittelwert mit SEM (*standard error of the mean*) angegeben.

	Pyramidenzelle n = 39	Körnerzelle n = 53
Fläche (in μm^2)	187,1 \pm 8,4 *	95,3 \pm 1,9
Umfang (in μm)	62,6 \pm 2,3 *	40,1 \pm 0,7
max. Zelldurchmesser (in μm)	24,8 \pm 1,1 *	16,3 \pm 0,4
min. Zelldurchmesser (in μm)	13,0 \pm 0,3 *	9,0 \pm 0,2

Tab. 6: Vergleich phänotypischer Parameter von Pyramiden- und Körnerzellen bei 6 DIV.
* = mit $p < 0,01$ signifikant größere Werte für Pyramidenzellen als für Körnerzellen

In der statistischen Auswertung der Daten ergaben sich für alle Parameter mit $p < 0,01$ hochsignifikante Unterschiede zwischen Pyramiden- und Körnerzellen.

Die nach der Aussaat vorhandene neuronale Zelldichte in den Kulturen reduziert sich in den ersten Tagen der Entwicklung. Verantwortlich dafür sind zum einen Beschädigungen der Zellen durch die Dissoziation und zum anderen intrinsische Apoptose-mechanismen (programmierter Zelltod). In Tab. 7 sind ausgezählte Zelldichten nach 2 DIV und 6 DIV dargestellt. Von der anfänglichen neuronalen Zellzahl (etwa 213 / mm^2) sind nach 6 DIV noch etwa ein Drittel vorhanden. Diese Neurone können aber über längere Kultivierungsperioden erhalten bleiben. Die Angabe der Anzahl der Neurone pro mm^2 erfolgt als Mittelwert mit SEM.

	2 DIV	6 DIV
neuronale Zelldichte	213,5 \pm 7,8	59,4 \pm 3,6

Tab. 7: Neuronale Zelldichte bei 2 und 6 DIV (Neurone/ mm^2)

Die häufigsten nicht-neuronalen Zellen in der hippocampalen Zellkultur sind Astrozyten, die mit dem Gliazell-Marker GFAP (= *glial fibrillary acidic protein*) gut visualisiert werden können. Die typisch sternförmig verzweigten Gliazellen, die mit zunehmendem Kulturalter durch mitotische Teilung immer zahlreicher werden, sind in der Abb. 14 dargestellt.

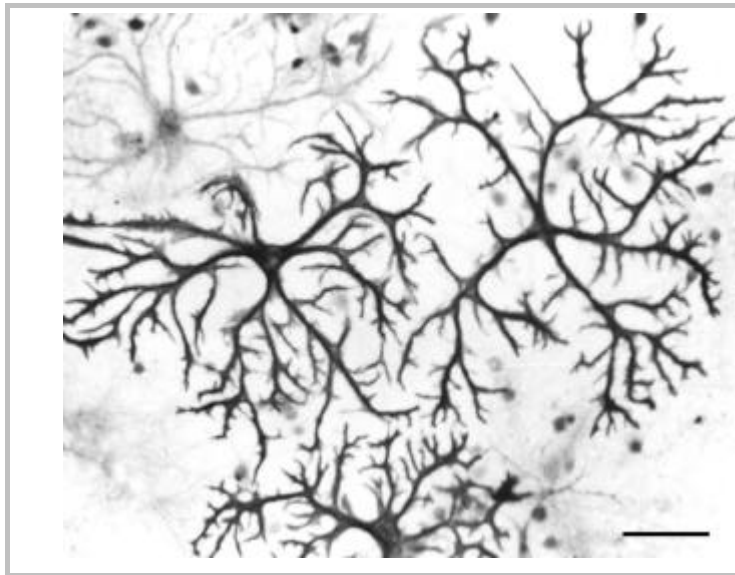


Abb. 14: Astrozyten in der hippocampalen Zellkultur; 18 DIV. Markierung mit dem Gliazellmarker GFAP, DAB-Entwicklung. Maßstab = 40 μ m

4.1.2 Differenzierung subzellulärer Strukturen der hippocampalen Neurone

Die frühen Entwicklungsstadien der hippocampalen Neurone bis zum 4. Tag *in vitro* zeigen in der elektronenmikroskopischen Darstellung einen exzentrisch gelegenen chromatinarmen Nucleus, der zum Teil gelappt erscheint. Die Mitochondrien sind klein, zeigen deutliche Cristae und haben eine feingranulierte Matrix. Sie sind besonders zahlreich in auswachsenden Dendriten. In der Abb. 15 sind quer- und längsgeschnittene Mitochondrien sowohl in Kernnähe als auch in einem auswachsenden Dendriten zu sehen (Pfeile). Der Golgi-Apparat ist abgrenzbar und schon nach 2 bis 3 DIV zu erkennen. Nach 6 DIV ist er gut ausgebildet (Abb. 16).

In der Peripherie der Perikarya und in den Fortsätzen sind Vesikel zu sehen, die ohne spezifische Immunreaktionen nicht näher identifizierbar sind. In Abb. 17 ist nach 6 DIV deutlich zu sehen, wie entlang der spaltförmigen Zone zwischen Dendrit und Axon zweier Zellen an sich gegenüberliegenden Membranen Verdichtungszone entstehen. Die Abbildung zeigt auch ein Endosom, das funktionell am Membranaufbau und am Recycling von Membrankomponenten beteiligt ist.

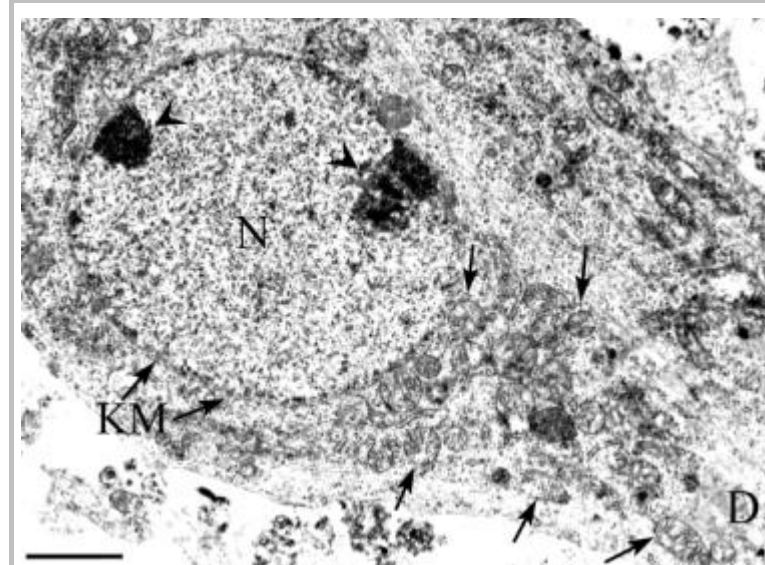


Abb. 15: Elektronenmikroskopisches Bild einer neuronalen Zelle nach 6 DIV. Dargestellt ist der exzentrisch gelegene Zellkern (N) eines Neurons, gefüllt mit lockerem Chromatin und randständigen Nucleoli (Pfeilspitzen). Die Kernmembran (KM) grenzt den Kern vom Zytoplasma ab. Kernnah liegen viele Mitochondrien (Pfeile), die aber auch im auswachsenden Dendriten (D) zu finden sind. Maßstab = 2 μ m

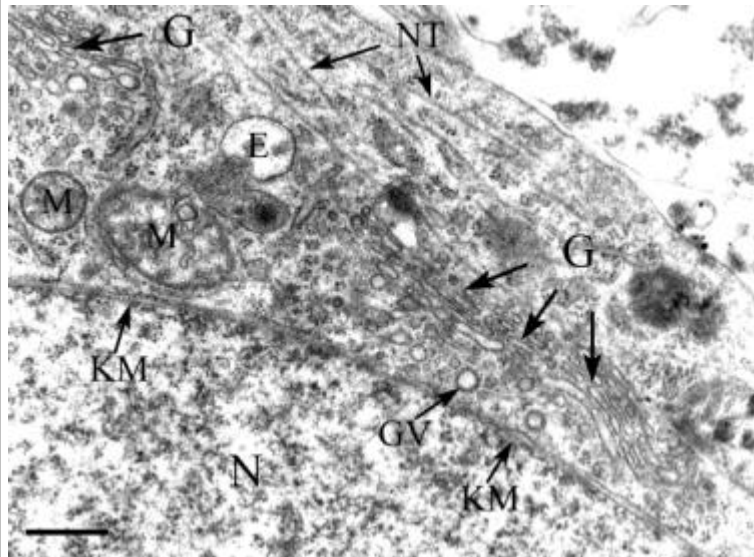


Abb. 16: Elektronenmikroskopisches Bild einer neuronalen Zelle nach 6 DIV. Im Zytoplasma ist ein gut ausgebildeter Golgi-Apparat zu sehen (G), von dem sich Golgivesikel (GV) abschnüren. Der von der Kernmembran (KM, deutliche Doppelkontur) begrenzte Nucleus (N) ist chromatingefüllt. Mitochondrien (M) und Neurotubuli (NT) sowie ein Endosom (E) sind zu sehen. Maßstab = 0,5 μ m

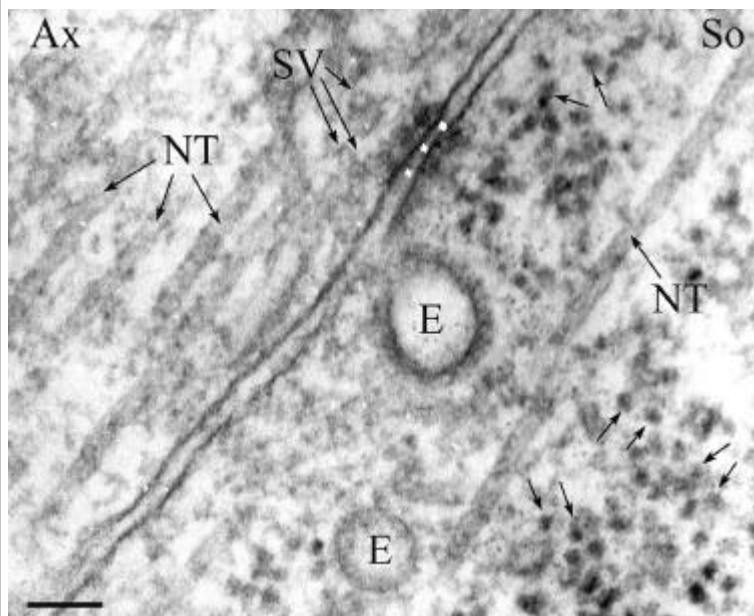


Abb. 17: Elektronenmikroskopisches Bild einer neuronalen Zelle nach 6 DIV. Gezeigt ist die Bildung einer axosomatischen Synapse. Im Soma (So) sind Neurotubuli (NT), zahlreiche Ribosomen und Polyribosomen zu sehen (kleine Pfeile). Der synaptische Spalt (Sterne) ist sichtbar und weist erste Verdichtungszone auf. Synaptische Vesikel (SV) befinden sich in der Nähe. Am Membranaufbau beteiligte Endosomen (E) sind zu sehen. Im Axon (Ax) sind Neurotubuli (NT) dargestellt. Maßstab = 0,1 μ m

In der Abb. 18 sind größere, klar erscheinende Vesikel, die Wachstumsvesikel, dargestellt. Sie befinden sich vorwiegend in axonalen Wachstumskolben, den growth cones, und sind mit 100 bis 120 nm größer als die etwa 50 nm großen synaptischen Vesikel. Die Axone zeigen häufig kolbenartige Auftreibungen, die sogenannten Varikositäten. Sie enthalten synaptische Vesikel, Mitochondrien und Endosomen (Abb. 19). Die in vielen Varikositäten dicht gelagerten synaptischen Vesikel sind Voraussetzung für spätere Synapsenbildung. Eine Bündelung von Axonen mehrerer Neurone ist in der Kultur nach 6 bis 7 DIV zu beobachten.

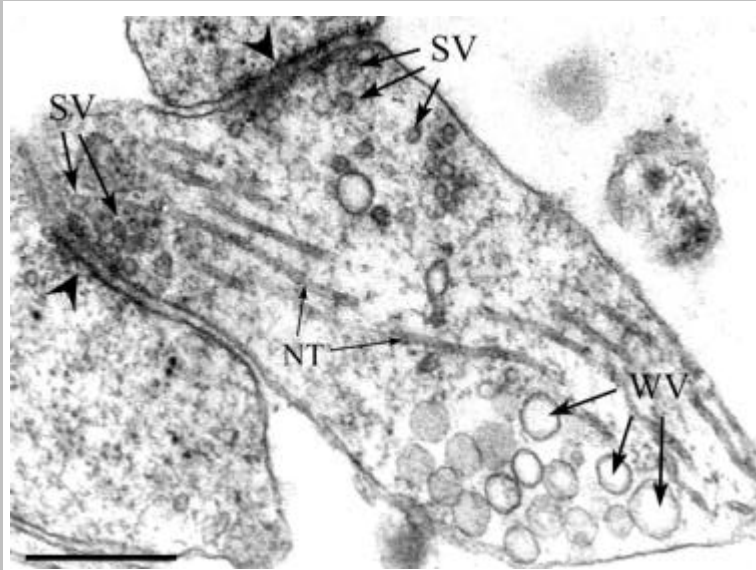


Abb. 18: Elektronenmikroskopisches Bild nach 6 DIV. In diesem Ausschnitt eines Axons sind sowohl synaptische Vesikel (SV) als auch Wachstumsvesikel (WV) dargestellt. Die runden synaptischen Vesikel befinden sich in der Nähe und direkt an dem durch Membranverdichtungen gekennzeichneten synaptischen Spalt (Pfeilspitzen). Die Wachstumsvesikel sind größer und erscheinen heller. Neurotubuli (NT) durchziehen das Zytoplasma. Maßstab = 0,5 μ m

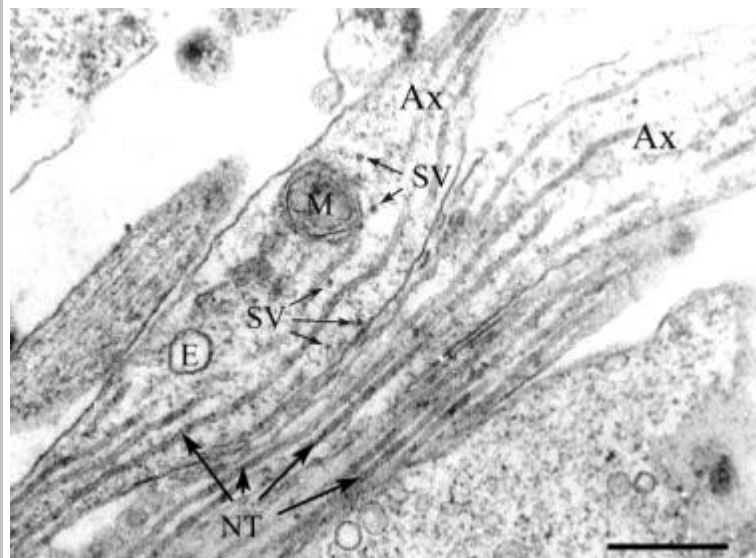
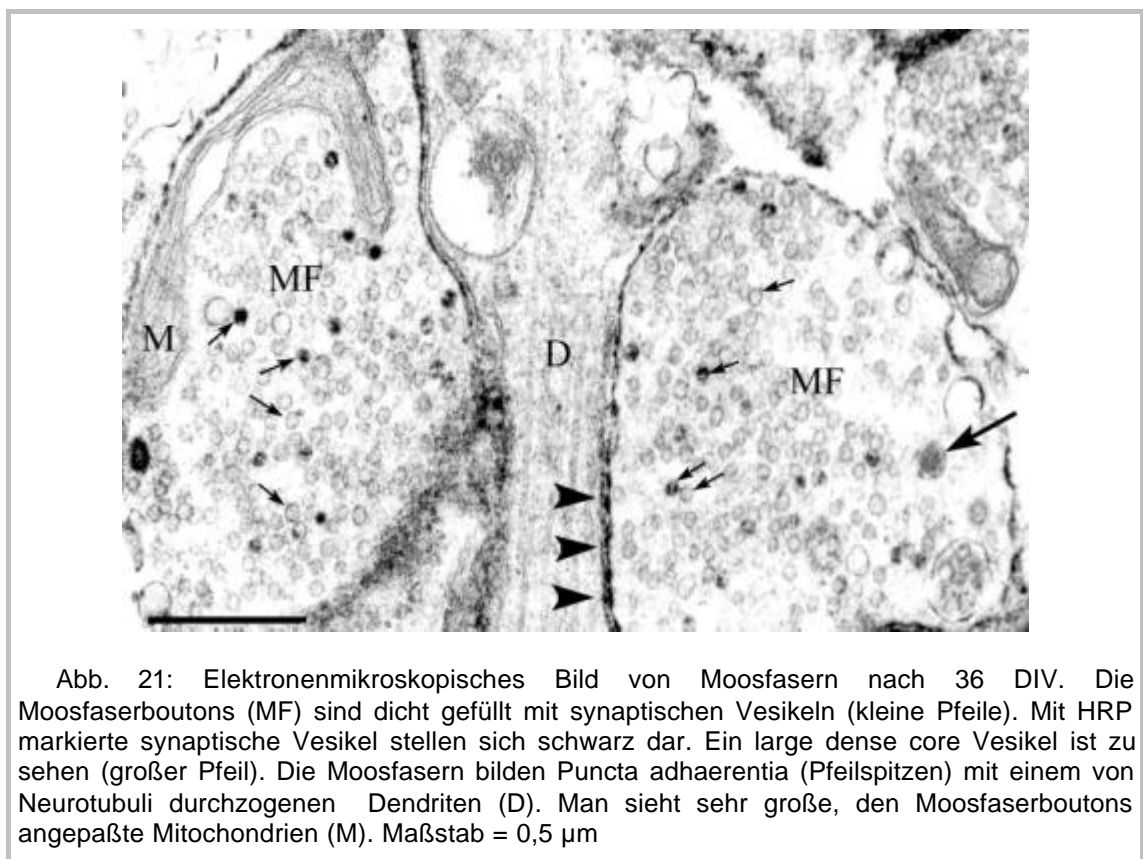
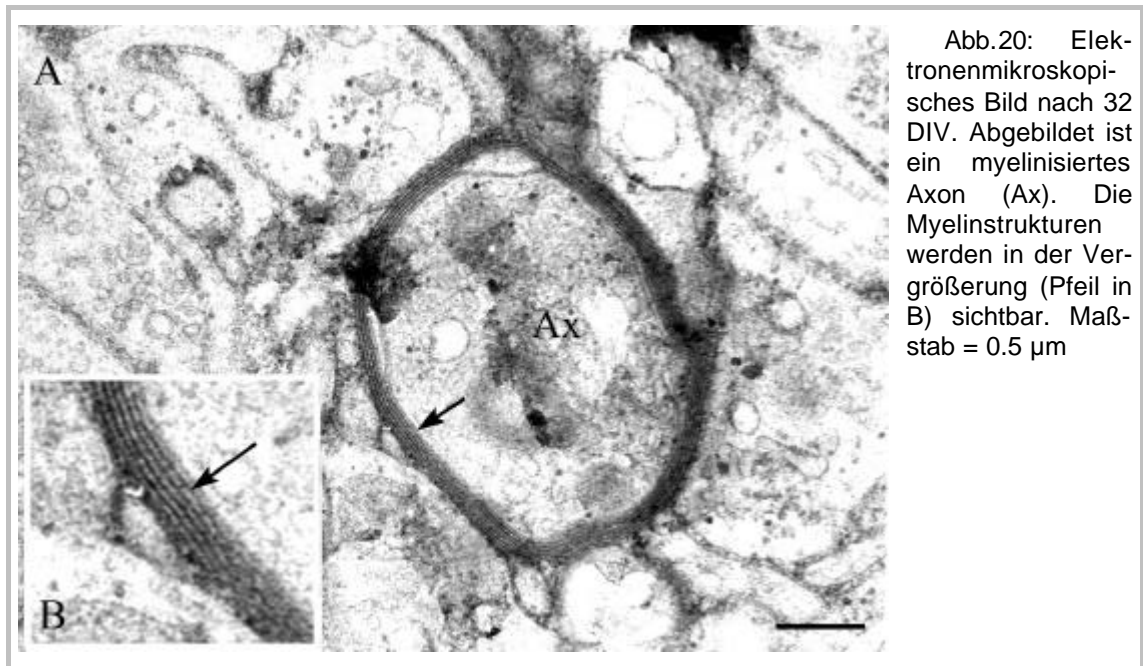


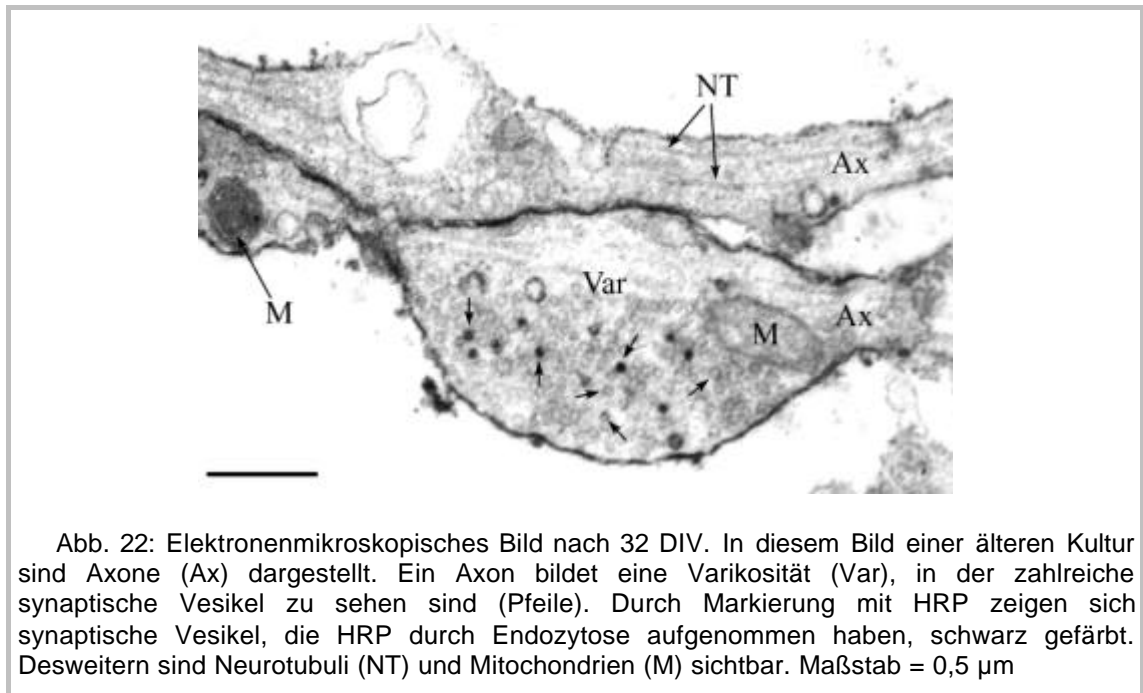
Abb. 19: Elektronenmikroskopisches Bild nach 6 DIV. Es sind Axonbündel (Ax) mit zahlreichen parallel liegenden Neurotubuli (NT) zu sehen. In der kolbenartigen Auftreibung des Axons, einer Varikosität, finden sich vereinzelt synaptische Vesikel (SV), ein Mitochondrium (M) und ein Endosom (E). Maßstab = 0,5 μ m

Im elektronenmikroskopischen Bild hippocampaler Kulturen ab 11 DIV ist das Zytoplasma der Zellen organellenreich, der Kern ist hell und gefüllt mit fein verteiltem Chromatin. Dieses fein verteilte Chromatin ist charakteristisch für neuronale Zellkerne, Gliazellkerne haben gröber strukturiertes, klumpiges Chromatin. Die Mitochondrien sind größer und zahlreicher als in frühen Stadien. In den auswachsenden Dendriten sind zahlreiche Neurotubuli, Mitochondrien, Ribosomen und Polyribosomen sowie endoplasmatisches Retikulum vorhanden. In den Axonen bilden die Neurotubuli parallele Bündel. Im Zytoplasma befindet sich sehr viel dicht besetztes rauhes endoplasmatisches Retikulum. Der Golgi-Apparat ist gut differenziert und reicht bis in die Dendriten.

Nach 10 DIV treten erste myelinisierte Axone auf. Nach 30 DIV findet man häufig myelinisierte Fasern, die Myelinringe sind deutlich sichtbar (Abb.20 B). Einige Axone bleiben unmyelinisiert. Diese unmyelinisierten Axone mit ihrem 4 bis 5 μ m großen Durchmesser stellen Moosfasern dar (siehe Abb. 21). Sie sind in ihren präsynaptischen Endigungen oft dicht mit synaptischen Vesikeln und auch dense-core-Vesikeln gefüllt. Moosfasern sind *in vivo* unmyelinisierte, dünne Axone der Körnerzellen der Area dentata des Hippocampus, die mit proximalen Teilen der apikalen Dendriten der Pyramidenzellen in synaptischen Kontakt treten. Diese synaptischen Moosfaserboutons sind bis zu 5 μ m groß. Sie entwickeln sich auch in der hippocampalen Zellkultur. Dies deutet darauf hin, daß die Mechanismen zur Bildung der Moosfasern intrinsische Eigenschaften der hippocampalen Formation sind.



In den Axonen der neuronalen hippocampalen Zellen findet man, wie weiter oben beschrieben, Varikositäten. Nach 32 DIV sind die kolbenartigen Auftreibungen dicht mit synaptischen Vesikeln besetzt, wie in der Abb. 22 zu sehen ist.



4.2 Verteilung der synaptischen Vesikelproteine Synaptobrevin und Synaptophysin während der Entwicklung der hippocampalen Zellkultur

In den beschriebenen hippocampalen Zellkulturen wurde nun die Expression der synaptischen Vesikelproteine Synaptophysin (SY) und Synaptobrevin (=VAMP-2, *vesicle associated membrane protein*) untersucht. In den sich entwickelnden Neuronen der Zellkultur von 17 Tage alten Mäuseembryonen erfolgte in jungen und älteren Kulturen die Beobachtung der Verteilung der synaptischen Vesikelproteine.

4.2.1 Verteilung von Synaptophysin

Das Protein wird sofort nach der Aussaat der Zellen exprimiert. In den frühen Stadien der Entwicklung findet sich für Synaptophysin ein Verteilungsmuster, das durch die Dominanz der Immunreaktion im Soma der Zellen gekennzeichnet ist. Die Bilder der mit anti-Synaptophysin behandelten Zellen zeigen nach 1 DIV eine starke Immunreaktion im Soma der Zelle, während die Fortsätze schwach gefärbt sind. (Abb. 23). Einer der Fortsätze ist im Vergleich zu den anderen merklich länger und etwas dünner und ebenfalls schwach angefärbt. Dieser Fortsatz ist das Axon der Zelle und schon nach 1 DIV von den Dendriten zu unterscheiden (siehe Pfeil + Ax in Abb. 23). Nach 2 DIV stellen sich Fortsätze und Perikarya der mit anti-Synaptophysin markierten Zellen ähnlich wie nach 1 DIV dar, was in der Abb. 24 deutlich wird. Nach 3 DIV sind erste punktuelle Immunreaktionen zu erkennen, was auf beginnende Anhäufung synaptischer Vesikel hinweist (siehe Pfeile in Abb. 25).

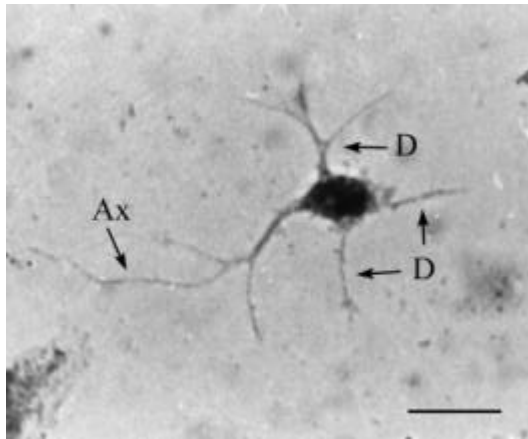


Abb. 23: Verteilung von Synaptophysin nach 1 DIV: starke Anreicherung im Perikaryon; Markierung mit anti-SY, DAB-Entwicklung, Ax=Axon, D=Dendriten, Maßstab = 10 µm

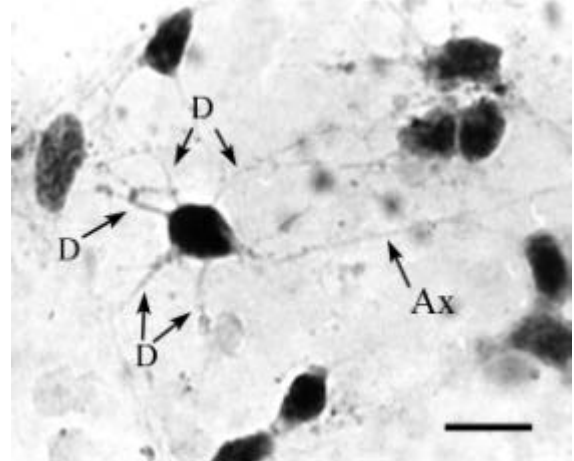


Abb. 24: Verteilung von Synaptophysin nach 2 DIV: starke Anfärbung des Perikaryons; Markierung mit anti-SY, DAB-Entwicklung, Ax=Axon, D=Dendriten, Maßstab = 10 µm

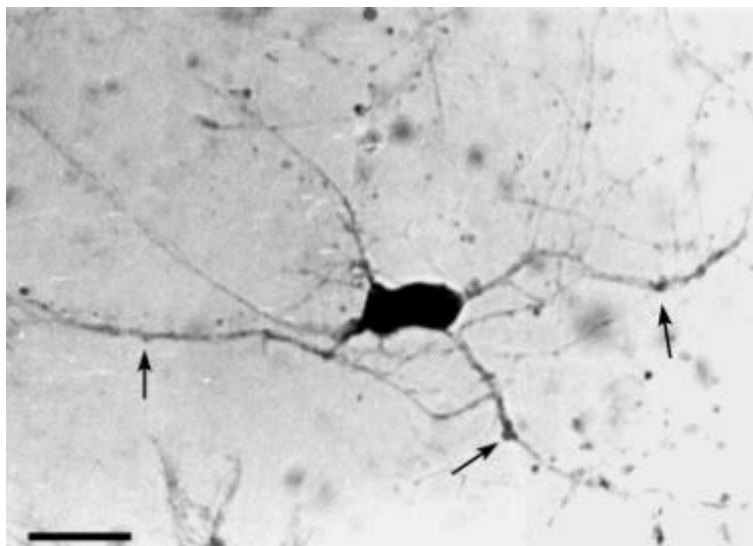


Abb. 25: Verteilungsmuster von Synaptophysin nach 3 DIV. Das Perikaryon zeigt Immunreaktionen, es sind auch erste punktuelle Immunreaktionen in den Zellfortsätzen zu sehen (Pfeile); Markierung mit anti-SY, DAB-Entwicklung. Maßstab = 10 µm

Verfolgt man die Entwicklung weiter, so ergibt sich nach 4 DIV eine deutliche Änderung des Verteilungsmusters. Die Neusynthese von Synaptophysin im Perikaryon nimmt ab. Man erkennt eine Aussparung des Nucleus, was dadurch bedingt ist, daß die massive Immunreaktion im Soma abnimmt und der Kern nicht mehr überfärbt wird. Die Immunreaktion im Perikaryon ist nur noch in einem kappenförmig erscheinenden Bereich um den Kern zu sehen. In dieser perinukleären Kappe, die im wesentlichen das endoplasmatische Retikulum und den Golgiapparat darstellt, erfolgt die Biosynthese und der Sortierungsprozeß von Synaptophysin. Die Immunreaktion für Synaptophysin im Bereich der Kappe ist in Abb. 26 zu sehen. Deutlich sind auch immunreaktive Punkte an den Fortsätzen der Zelle nachweisbar (siehe Pfeil in Abb. 26), die auf beginnende Anhäufungen synaptischer Vesikel hindeuten.

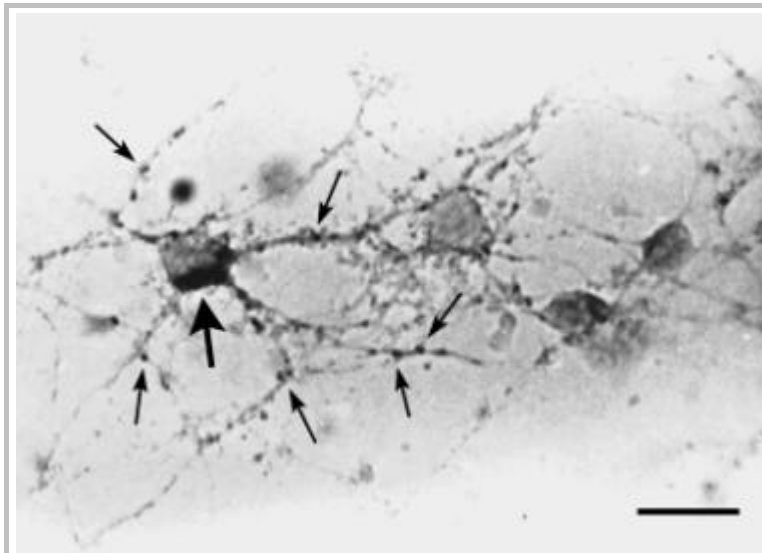


Abb. 26: Verteilung von Synaptophysin nach 4 DIV. Die Immunreaktion im Perikaryon hat sich in die perinukleäre Kappe verlagert (dicker Pfeil), punktuelle Immunreaktionen an den Zellfortsätzen sind deutlich und lassen auf Anhäufungen synaptischer Vesikel schließen (dünne Pfeile); Markierung mit anti-SY, DAB-Entwicklung. Maßstab = 10 µm

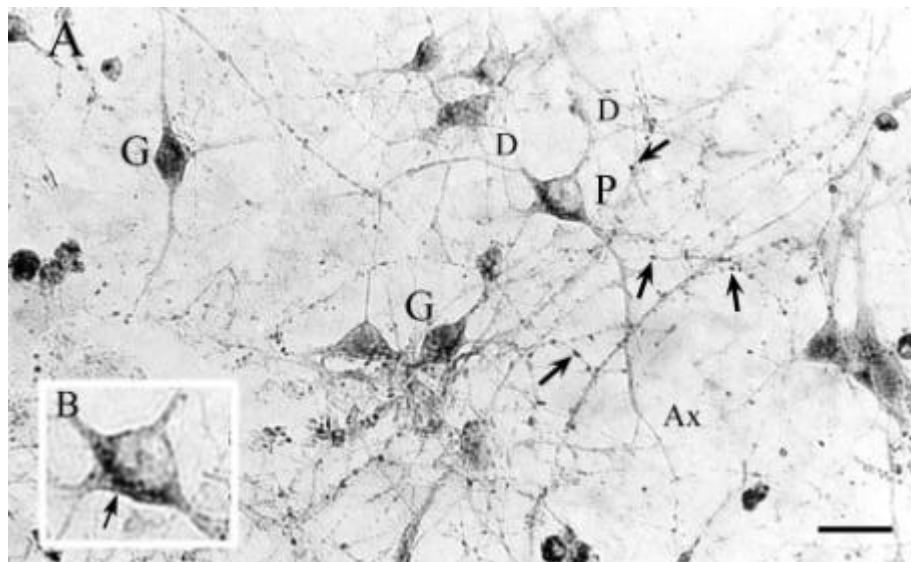


Abb. 27: Verteilung von Synaptophysin nach 6 DIV. An den Fortsätzen der Pyramidenzellen (P) und der Körnerzellen (G) sind viele immunreaktive Punkte zu sehen (Pfeile in A), die Synapsen darstellen. Die Immunreaktion im Soma der Zellen hat sich in die perinukleäre Kappe verlagert, wie in der Ausschnittsvergrößerung zu sehen ist (Pfeil in B). Markierung mit anti-SY, DAB-Entwicklung, Ax=Axon, D=Dendriten, Maßstab = 15 µm (für A)

Das Verteilungsbild der späteren Stadien ist gekennzeichnet durch punktuelle Immunreaktionen, die im elektronenmikroskopischen Bild Synapsen darstellen. Man erkennt, daß die Immunreaktivität innerhalb des Perikaryons schwächer wird. Ab dem elften Tag *in vitro* findet sich kaum noch Synaptophysin-spezifische Immunreaktivität innerhalb des Zellsomas, aber das Perikaryon ist von außen dicht mit immunreaktiven Punkten besetzt. Diese Punkte erweisen sich im elektronenmikroskopischen Bild als axosomatische Synapsen. Die Fortsätze der Neurone weisen zahlreiche Verzweigungen auf und haben viele synaptische Kontakte untereinander, die sich durch zahlreiche immunreaktive Punkte darstellen. Die Punkte liegen den Zellfortsätzen auf und entsprechen axodendritischen Synapsen. Die so entstehenden perlenkettenähnlichen Formationen konfluieren teilweise zu regelrechten Strängen, die sich im elektronen-mikroskopischen Bild als dicht an dicht liegende Synapsen erweisen. Sie umgeben den gesamten Dendriten und lassen zentrale dendritische Strukturen frei. Das Axon ist überwiegend unmarkiert, da zu diesem Zeitpunkt Transportvesikel mit Synaptophysin nur noch in sehr geringem Maße vorkommen. Die Strangbildung wird in der Abb. 28 deutlich (siehe Pfeile). In der Abb. 29 sind einzelne Zelleiber nicht mehr durch Immunfluoreszenzen markiert.

Die rege Immunreaktivität in zahlreichen axosomatischen und axodendritischen Synapsen sowie die Aussparung der Zelleiber erkennt man deutlich bei stärkerer Vergrößerung in der Abb. 30.

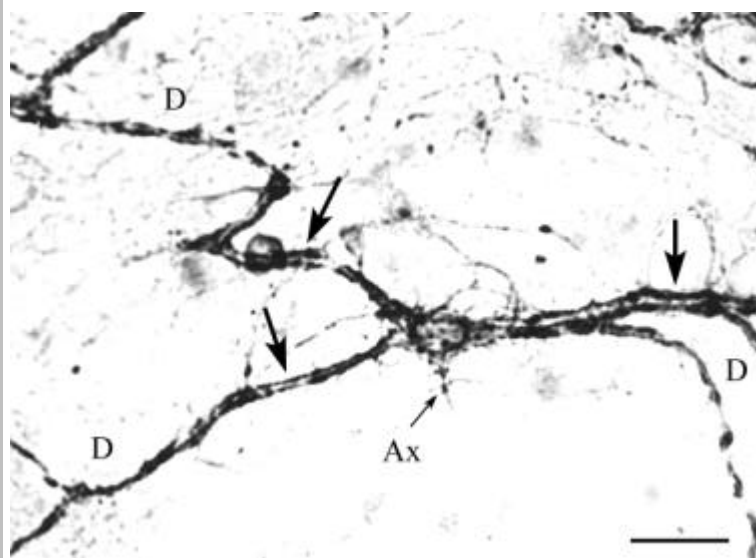


Abb. 28: Verteilung von Synaptophysin nach 18 DIV. Die immunreaktiven Punkte an den Dendriten (D) konfluieren zu Strängen (Pfeile). Im Axon (Ax) ist kein Synaptophysin zu sehen, es befindet sich zum größten Teil in den Synapsen. Markierung mit anti-SY, DAB-Entwicklung, Maßstab = 15 µm

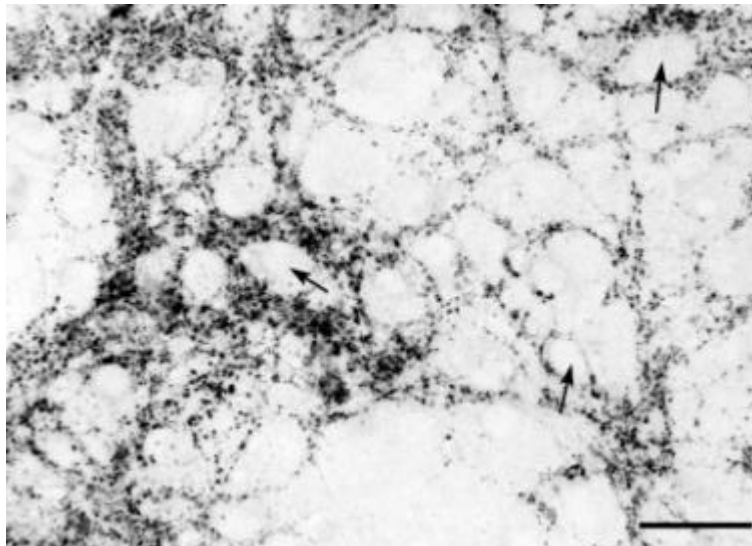


Abb. 29: Verteilung von Synaptophysin nach 20 DIV. In dieser Abbildung ist sehr gut zu sehen, wie die Zelleiber (Pfeile) von der Immunreaktion ausgespart bleiben. In der Zellperipherie finden sich zahlreiche immunreaktive Punkte, die Zellen haben ein dichtes synaptisches Netz ausgebildet. Invertierung eines Fluoreszenzfotos, Färbung nach Fluoreszenzmethode, Markierung mit anti-SY, Maßstab = 15 µm

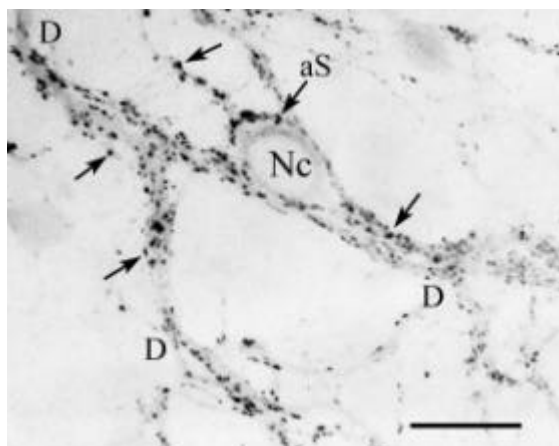


Abb. 30: Verteilung von Synaptophysin nach 20 DIV. Es sind deutlich immunreaktive Punkte an den Dendriten (D) und auf dem Soma der Zelle zu sehen. Sie entsprechen axosomatischen (Pfeil mit aS) und axodendritischen (andere Pfeile) Synapsen. Das Perikaryon und der Nucleus (Nc) sind ungefärbt. Invertierung eines Fluoreszenzfotos, Markierung mit anti-SY, Färbung nach Fluoreszenzmethode. Maßstab = 10 µm

4.2.1.1 Darstellung von Synaptophysin im Immuno-Blot

Synaptophysin zeigt sich im Blot pränatalen hippocampaler Zellen bereits nach 1 DIV mit seiner typischen Bande bei 38 kDa. Die Bande ist nach 6 DIV nicht stärker als nach 1 DIV, da die anfangs hohe Proteinsynthese im Perikaryon nachläßt. Mit wachsender Zahl von synaptischen Strukturen und damit der Zunahme von Synaptophysin findet sich nach 14 DIV eine stärkere Bande für das Vesikelprotein (siehe Abb. 31).

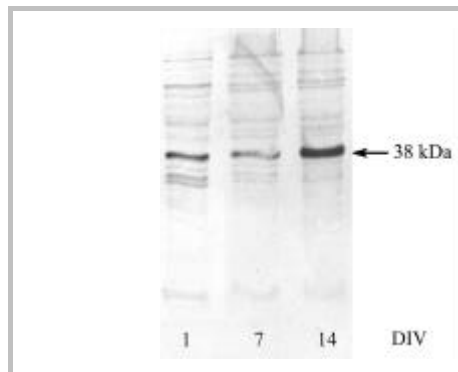


Abb. 31: Immunoblot für Synaptophysin bei 1, 7 und 14 DIV. Markiert ist die Synaptophysin-Bande bei 38 kDa (Pfeil). Der Nachweis erfolgte an Material aus Kulturen nach 1, 7 und 14 DIV. Im Vergleich zu den ersten beiden Stadien ist nach 14 DIV eine deutlich stärkere Bande sichtbar. 12% Gel, 15 µg Protein.

4.2.2 Verteilung von Synaptobrevin

Die Expression von Synaptobrevin während der Entwicklung der hippocampalen Zellkultur ergibt ein ähnliches Bild. So finden sich immunspezifische Reaktionen nach der Behandlung der Zellen mit anti-Synaptobrevin-Antikörper nach 1 DIV im Soma. Erst nach 3 bis 4 DIV zeigen sich punktuelle Immunreaktionen, was auf die Anhäufung synaptischer Vesikel in Axonen hinweist. In den späteren Stadien sind viele immunreaktive Punkte an den Dendriten nachzuweisen, die sich im elektronenmikroskopischen Bild als Synapsen darstellen. In der Abb. 32 (6 DIV) finden sich die Immunreaktivitäten vorwiegend im Perikaryon und in wenigen punktuellen Reaktionen an den Dendriten (Pfeile). Die Abb. 33 (14 DIV) zeigt dagegen deutlich die perinukleäre Kappe (siehe Pfeilspitze) sowie punktuelle Immunreaktionen an den Dendriten (Pfeile).

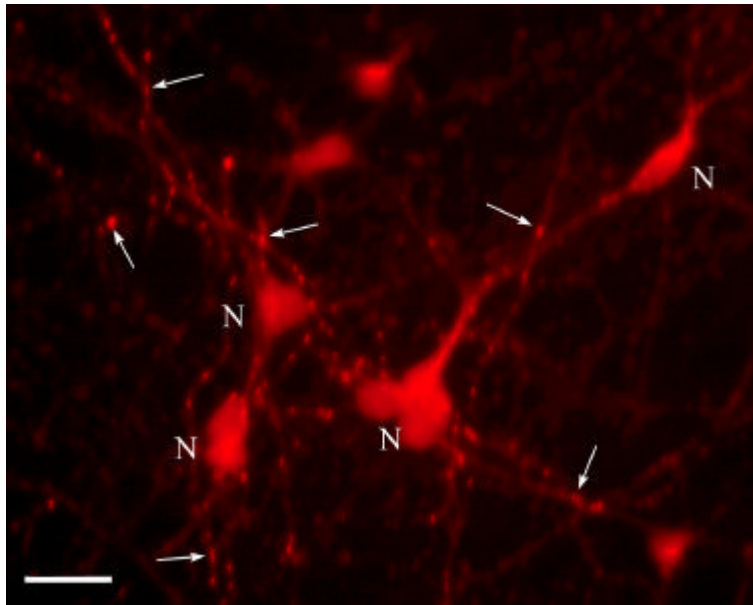


Abb. 32: Verteilung von Synaptobrevin nach 6 DIV. Die Perikarya der dargestellten Neurone (N) sind mit starker Immunreaktion zu sehen. An den Dendriten sind punktuelle Immunreaktionen nachweisbar (Pfeile), die Synapsen entsprechen. Fluoreszenzmethode, Markierung mit anti-Synaptobrevin. Maßstab = 15 µm

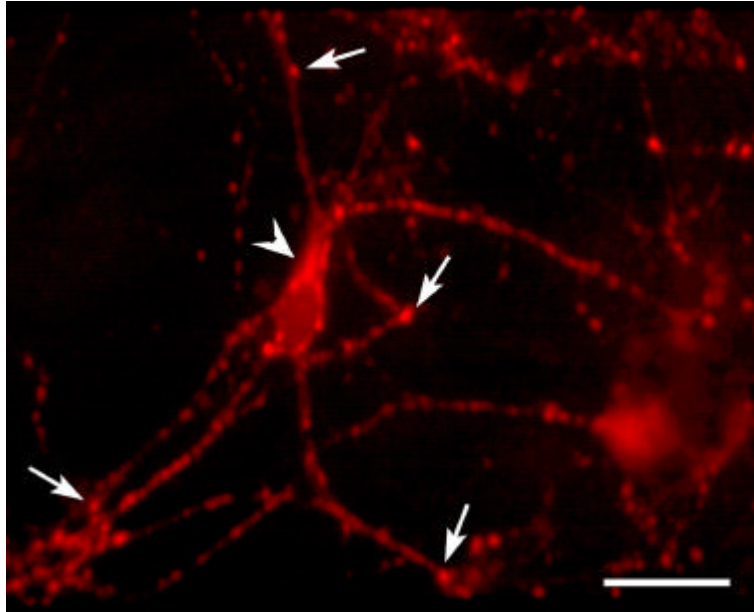


Abb. 33: Verteilung von Synaptobrevin nach 14 DIV. Die Immunreaktion im Perikaryon des dargestellten Neurons findet sich in einer perinukleären Kappe (Pfeilspitze). An den Dendriten finden sich zahlreiche immunreaktive Punkte (Pfeile). Fluoreszenzmethode, Markierung mit anti-Synaptobrevin. Maßstab = 20 μ m

4.2.3 Synaptogenese und Verteilung der synaptischen Vesikelproteine Synaptophysin und Synaptobrevin im elektronenmikroskopischen Bild

Die Axone der hippocampalen Neurone bilden nach 6 bis 7 DIV Synapsen mit Dendriten oder Somata. Es sind meist Synapsen vom asymmetrischen Typ (Gray I) mit einem 10 bis 40 nm großen synaptischen Spalt und postsynaptischen Membranverdichtungen. Die präsynaptischen Axonterminalen sind mit dicht gelagerten runden synaptischen Vesikeln gefüllt (Abb. 34 und Abb. 35), während die postsynaptischen Dendriten durch das Vorkommen von Mitochondrien (M in beiden Abbildungen), Neurotubuli und endozytotischen Vesikeln gekennzeichnet sind. Der axodendritische Kontakt erfolgt oftmals an fingerförmigen Ausstülpungen des Dendriten, den sogenannten „dendritic spines“. In Abb. 35 ist eine solche axospinodendritische Synapse dargestellt.

In den synaptischen Vesikeln der Abbildungen 34 und 35 ist Synaptophysin durch die Preembedding-Methode der Goldmarkierung mit Silberverstärkung des anti-Synaptophysin-Antikörpers markiert. Nahezu alle synaptischen Vesikel in der Präsynapse weisen Immunreaktivität für Synaptophysin auf. Bemerkenswert ist das Vorkommen von Synaptophysin in Dendriten, wie es im Spine der Abb. 35 eindeutig zu sehen ist. Weitergehende regulatorische Funktionen außerhalb der Synapse lassen sich daraus für Synaptophysin annehmen.

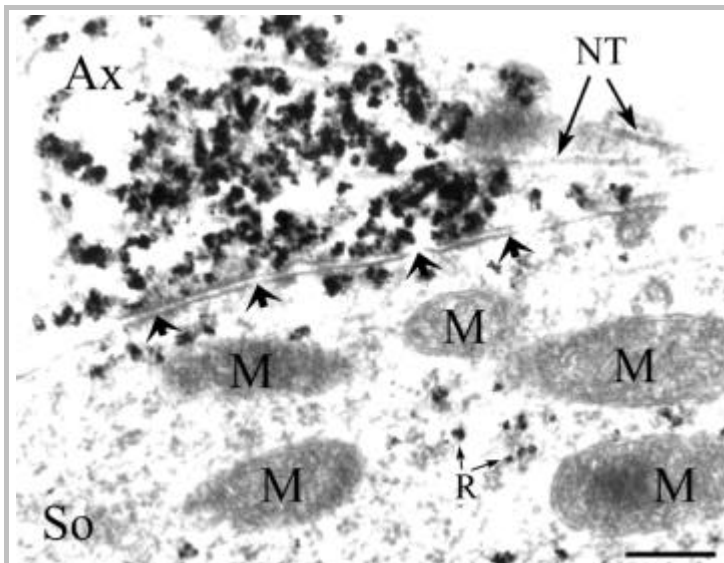


Abb. 34: Elektronenmikroskopisches Bild einer axosomatischen Synapse nach 14 DIV. Markierung mit Synaptophysin. In der axonalen Präsynapse (Ax) sind zahlreiche synaptische Vesikel zu sehen, die hier mit Synaptophysin markiert sind (schwarze Punkte). Das Axon wird von Neurotubuli (NT) durchzogen. Der synaptische Spalt ist deutlich abgrenzbar (Pfeilspitzen). Im Soma (So) sind Mitochondrien (M) und Ribosomen (R) zu sehen. Maßstab = 0,5 μ m

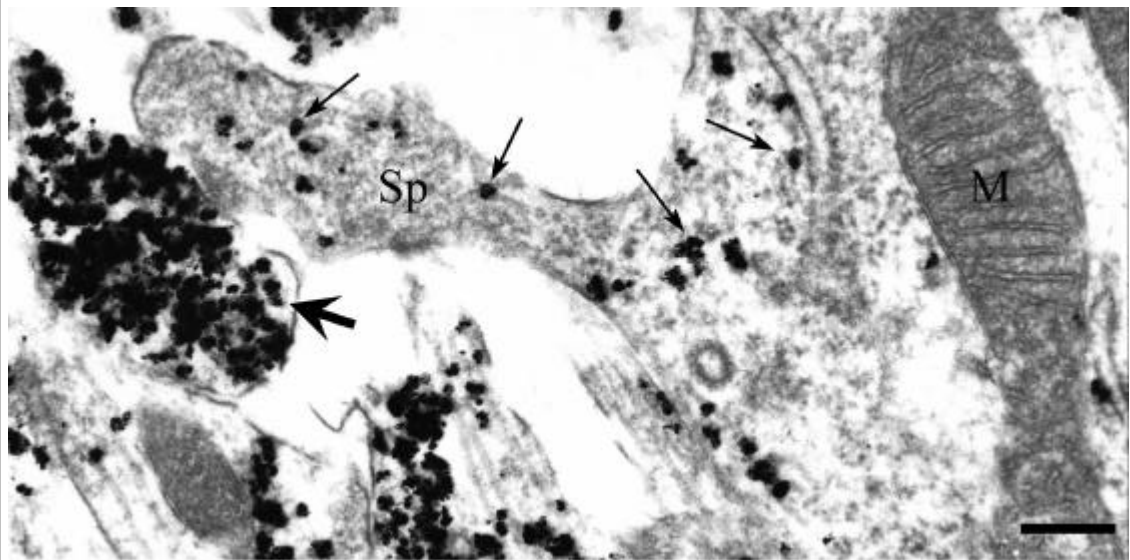


Abb. 35: Elektronenmikroskopisches Bild nach 14 DIV. Markierung mit Synaptophysin. Abgebildet ist eine axospinodendritische Synapse. Spine (Sp) und axonale Präsynapse (dicker Pfeil) bilden einen synaptischen Kontakt. Das Präsynapse ist mit synaptischen Vesikeln gefüllt, die hier mit Synaptophysin markiert sind. Auch im Spine sind Synaptophysin-positiv immunreaktionen sichtbar (Pfeile), was darauf hinweist, daß das Protein auch außerhalb der Synapse an regulatorischen Prozessen beteiligt ist. Desweiteren ist ein Mitochondrium (M) im Dendriten dargestellt. Maßstab = 0,5 μ m

Die Immunreaktion für Synaptobrevin ist in Abb. 36 zu sehen. Erstaunlicherweise sind nicht alle synaptischen Vesikel in der Präsynapse mit dem Vesikelprotein markiert.

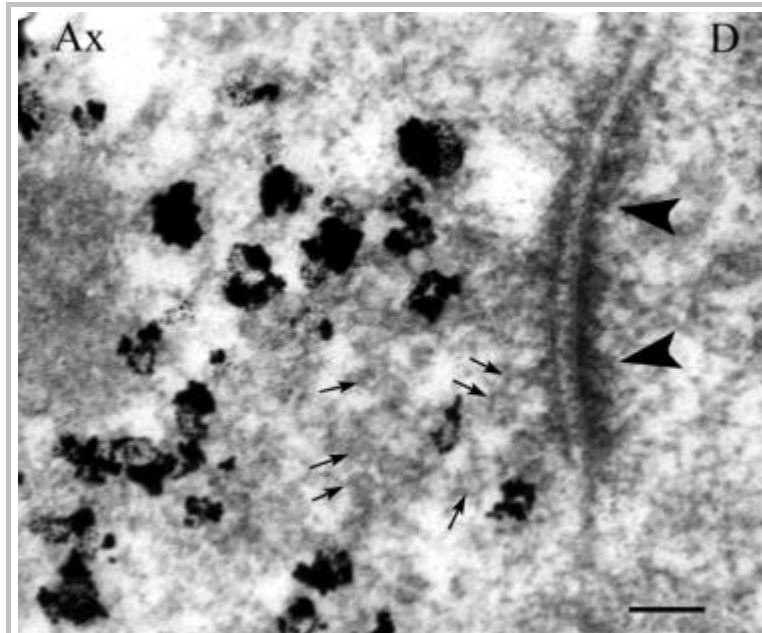


Abb. 36: Elektronenmikroskopisches Bild einer axodendritischen Synapse nach 15 DIV. Markierung mit Synaptobrevin. Der synaptische Spalt zwischen Axon (Ax) und Dendrit (D) weist subsynaptische Membranverdichtungen auf (Pfeilspitzen). In der Präsynapse sind zahlreiche synaptische Vesikel zu sehen. Mit dem synaptischen Vesikelprotein VAMP-2 markierte Vesikel stellen sich schwarz dar. Ein großer Teil der Vesikel bleibt unmarkiert (Pfeile). Maßstab = 0,1 µm

4.3 Einfluß von Tetanustoxinbehandlung und Synaptophysin-Depletion auf die Entwicklung der hippocampalen Zellkultur

Da Synaptobrevin durch Tetanustoxin gespalten wird, galt dem Einfluß von Tetanustoxin auf die neuronale Zellkultur besonderes Interesse. Die Folgen der Depletion von Synaptophysin auf die Zellkultur wurden ebenfalls untersucht. Dazu wurden verschiedene Versuche durchgeführt, deren Ergebnisse nachfolgend dargestellt werden. Zur mikroskopischen Beurteilung der Zellkultur und eventueller Unterschiede der einzelnen Versuchsreihen wurden folgende Schwerpunkte herangezogen:

- Beurteilung der Morphologie von Perikaryon und Fortsätzen der Einzelzellen
- Beurteilung der Synaptogenese
- Beurteilung der Verteilung der synaptischen Vesikelproteine Synaptobrevin und Synaptophysin

4.3.1 Einfluß der Spaltung von Synaptobrevin durch Tetanustoxin auf die Entwicklung der hippocampalen Zellkultur

Wie in der Einleitung erwähnt wurde, ist bekannt, daß für die Exozytose der Neurotransmitter der Fusions-Komplex aus Synaptobrevin (VAMP-2), Syntaxin und SNAP25 (synaptosome associated protein of 25 kDa) entscheidend ist. Tetanusneurotoxin (TeTx) spaltet das Protein Synaptobrevin spezifisch und unterbindet damit die Exozytose.

Mit diesem Wissen erschien es sinnvoll, zu untersuchen, ob TeTx einen Einfluß auf die Entwicklung der hippocampalen Zellkultur hat, bzw. welche Veränderungen in der Kultur auftreten, wenn Synaptobrevin funktionell ausgeschaltet wird.

Zunächst war es notwendig, den minimal wirksamen Konzentrationsbereich des Toxins für die Spaltung von Synaptobrevin in der Zellkultur zu ermitteln, um andere toxische Prozesse, die bei höheren Toxingaben etwa durch die Beeinflussung von Ionenkanälen auftreten könnten, soweit wie möglich auszuschließen. Hierzu wurden aufsteigende Konzentrationen von TeTx (0,1 pM bis 1 nM) zu den Zellkulturen gegeben. Zur Visualisierung der Synapsen und der Wirkung des Toxins wurde eine Doppelfluoreszenzmarkierung durchgeführt, bei der zusätzlich zum Anti-VAMP-2-Antikörper (monoklonal) als zweiter Antikörper Anti-Synapsin-Antikörper

(polyklonal) verwendet wurde. Letzterer dient hier als Marker für Synapsen. Synapsin ist ein assoziiertes synaptisches Vesikelprotein, welches für Interaktion mit dem Zytoskelett an der Präsynapse sorgt. Beide Antikörper wurden mit verschiedenen Fluoreszenz-farbstoffen (CY2=Carbocyanin und CY3=Indocarbocyanin) markiert, welche an einem Fluoreszenzmikroskop mit dem Mischfilter U-M51004 der Firma Olympus gleichzeitig sichtbar gemacht werden konnten. Immunreaktionen für Synapsin alleine stellen sich dabei grün (CY2) dar, VAMP-2 alleine zeigt sich rot (CY3). Sind beide Proteine kolokalisiert, also VAMP-2 ungespalten und aktiv in einer Synapse vorhanden, so entsteht durch die Überlagerung der Fluoreszenzen ein gelber Farbton.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Resultate dieser Testung. In Abb. 37 und Abb. 38 sind in der Kontrolle und bei einer Konzentration von 0,1 pM TeTx deutlich gelbe Punkte zu sehen. Dies bedeutet, daß Synapsin und Synaptobrevin kolokalisiert sind, VAMP-2 also bei der Konzentration von 0,1 pM TeTx nicht merklich gespalten wird und die Synapsen noch über die volle Ausstattung ihrer Vesikelproteine verfügen. Bei einer Konzentration von 10 pM TeTx sind sowohl gelbe als auch einzelne grüne Punkte zu sehen (Abb. 39). Das heißt, daß einzelne VAMP-2-Moleküle schon gespalten sind, während andere ungespalten bleiben.

Bei einer Konzentration von 100 pM TeTx ist das gesamte VAMP-2 gespalten. Daher sind keine gelben Punkte, die VAMP-2 in der Kolokalisation mit Synapsin darstellen, mehr sichtbar (Abb. 40). Der Bereich der perinukleären Kappe stellt sich jedoch gelb dar, was zeigt, daß Synapsin und auch VAMP-2 noch produziert werden. Bei der Konzentration von 1 nM TeTx sind keine gelben Immunreaktionen zu sehen, auch nicht im Perikaryon. VAMP-2 ist vollständig gespalten und nicht mehr in Synapsen und Perikarya vorhanden (siehe Abb. 41).

Die Zellkulturen der Abb. 21 bis 25 wurden nach 6 DIV mit anti-Synapsin- und anti-VAMP-2-Antikörpern markiert und nach der Doppelfluoreszenzmethode gefärbt. Die Zugabe des Tetanustoxins erfolgte 24 h vor der Fixierung der Zellen. Weitere Versuchsreihen mit unterschiedlicher Einwirkungsdauer des Toxins (1 bis 5 DIV) ergaben vergleichbare Ergebnisse und sind hier nicht dargestellt.

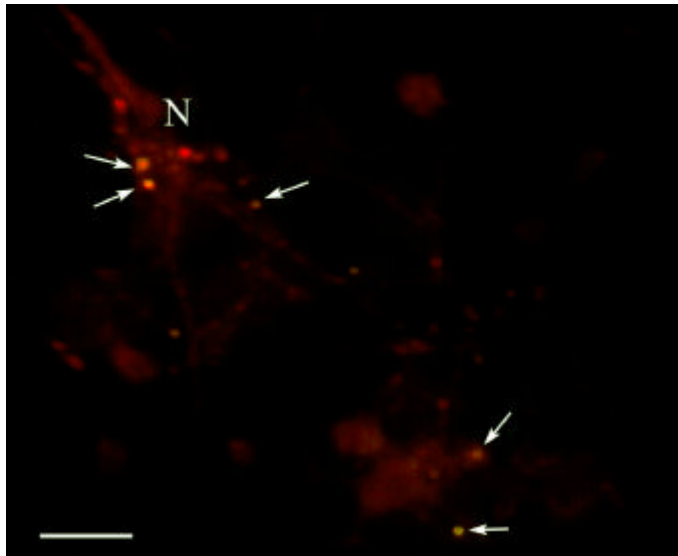


Abb. 37: Konzentrationsabhängige Spaltung von VAMP-2 durch Tetanustoxin, Kontrolle. Deutlich sind gelbe Punkte zu sehen (Pfeile), die der Kolokalisation von VAMP-2 und Synapsin in Synapsen entsprechen. N = Neuron. Maßstab = 15 µm

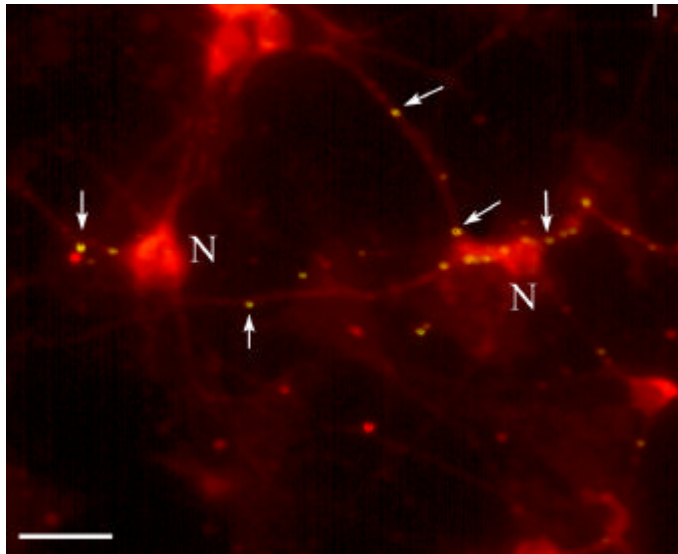


Abb. 38: Konzentrationsabhängige Spaltung von VAMP-2 durch Tetanustoxin, Konzentration von 0,1 pM TeTx. Die Pfeile zeigen auf gelbe Immunreaktionen, die der Kolokalisation von VAMP-2 und Synapsin an Synapsen entsprechen. Synaptobrevin ist noch nicht gespalten. N=Neuron
Maßstab = 15 μ m

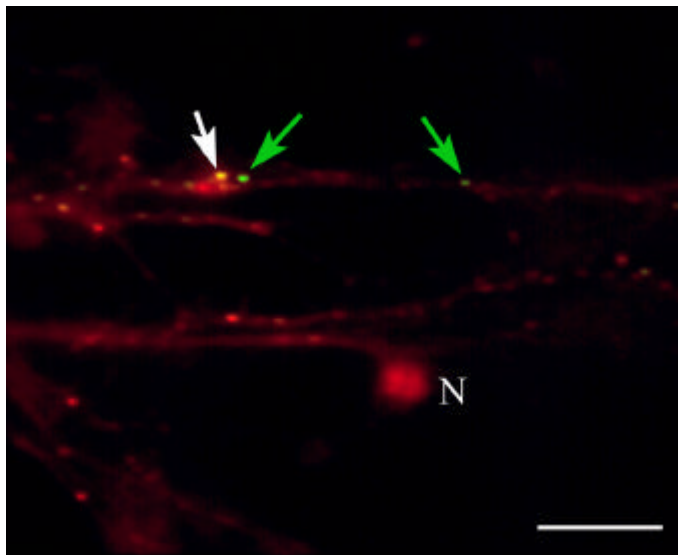


Abb. 39: Konzentrationsabhängige Spaltung von VAMP-2 durch Tetanustoxin, Konzentration von 10 pM TeTx. Es sind vereinzelt grüne Punkte zu sehen, an denen durch die Spaltung von VAMP-2 nur Synapsin nachweisbar ist (grüner Pfeil). In gelben Punkten sind beide Proteine kolokalisiert (weißer Pfeil). N=Neuron
Maßstab = 20 μ m

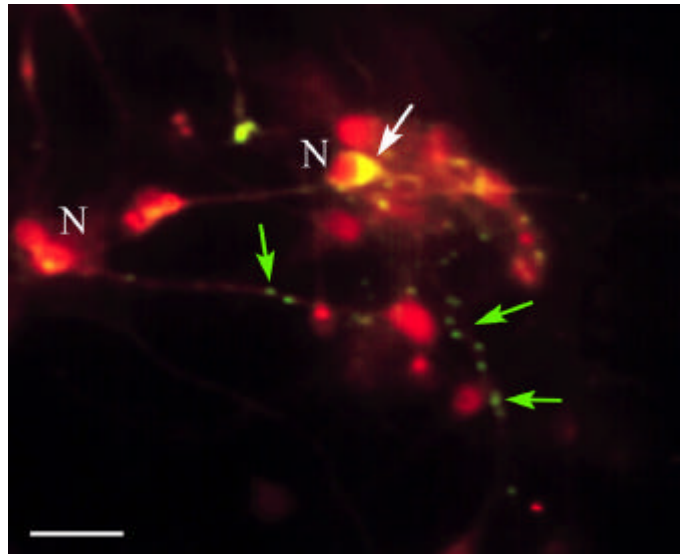


Abb. 40: Konzentrationsabhängige Spaltung von VAMP-2 durch Tetanustoxin, Konzentration von 100 pM TeTx. Gelbe Immunreaktionen sind in der perinukleären Kappe zu sehen (weißer Pfeil), dort werden VAMP-2 und Synapsin noch produziert. An den Fortsätzen der Neurone sind nur noch grüne Punkte zu sehen, d.h. VAMP-2 ist gespalten und findet sich nicht mehr in Synapsen (grüne Pfeile), wohingegen Synapsin vorhanden ist. N=Neuron Maßstab = 20 μ m

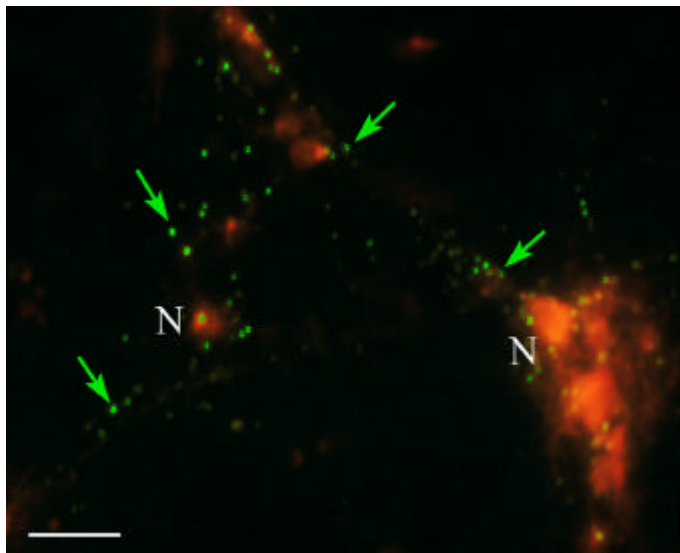


Abb. 41: Konzentrationsabhängige Spaltung von VAMP-2 durch Tetanustoxin, Konzentration von 1 nM TeTx. Weder in den Perikarya noch an den Zellfortsätzen sind gelbe Punkte zu sehen. Alles VAMP-2 ist gespalten, es findet sich nicht mehr in den Synapsen. Synapsin ist weiterhin nachweisbar (grüne Pfeile). N=Neuron Maßstab = 20 μ m

Um die Auswirkungen der Inaktivierung von Synaptobrevin durch TeTx auf das Wachstum und die Entwicklung hippocampaler Zellkulturen zu untersuchen, wurden Kulturen verschiedener Entwicklungsstadien nach Behandlung mit 1nM TeTx fixiert und im Phasenkontrast sowie mit verschiedenen dendritischen und synaptischen Markern untersucht. Dabei ergaben sich licht- und fluoreszenzmikroskopisch keine Unterschiede zu unbehandelten Kulturen. Das Zellwachstum erschien regelrecht. Zelldichte und Zellverteilung sowie die Vernetzung der Neurone untereinander waren im Vergleich zu Kontrollkulturen unverändert.

Das morphologische Erscheinungsbild von Perikarya und Neuriten der Körner- und Pyramidenzellen gleicht dem unbehandelter Kulturen. Auch können nach 3 bis 4 DIV Ansammlungen synaptischer Vesikel nachgewiesen werden, wie in Abb. 42 anhand der Markierung mit rab3A sichtbar gemacht wird (siehe Pfeil). Rab3A ist ebenfalls ein synaptisches Vesikelprotein und somit Marker für synaptische Vesikel. Die perinukleäre Kappe als Indiz für die Proteinbiosynthese ist gut sichtbar (Pfeilspitze). In Abb. 43 liegen immunreaktive Punkte auch dem Perikaryon der Zelle auf, diese entsprechen axosomatischen Synapsen (Pfeile + aS).

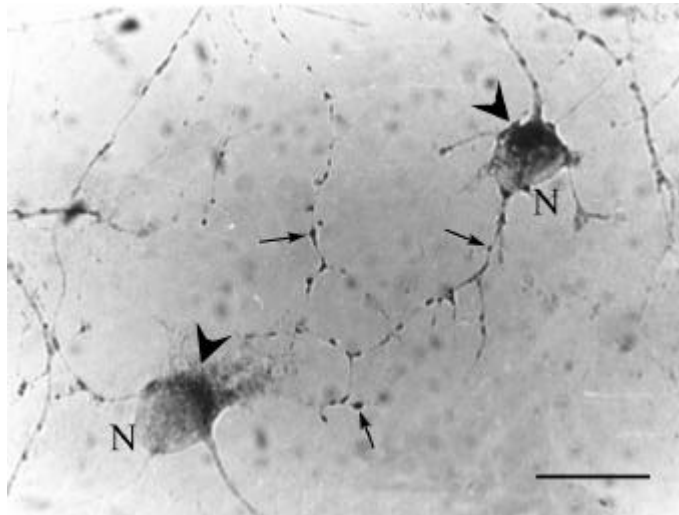


Abb. 42: Einfluß von TeTx auf die Zellkultur nach 5 DIV. Die normal entwickelten Neurone (N) zeigen Immunreaktion in einer perinukleären Kappe (Pfeilspitze). An den Fortsätzen sind punktuelle Reaktionen sichtbar (Pfeile), die Synapsen entsprechen. Markierung mit anti-rab3A, DAB-Entwicklung. Maßstab = 20 µm

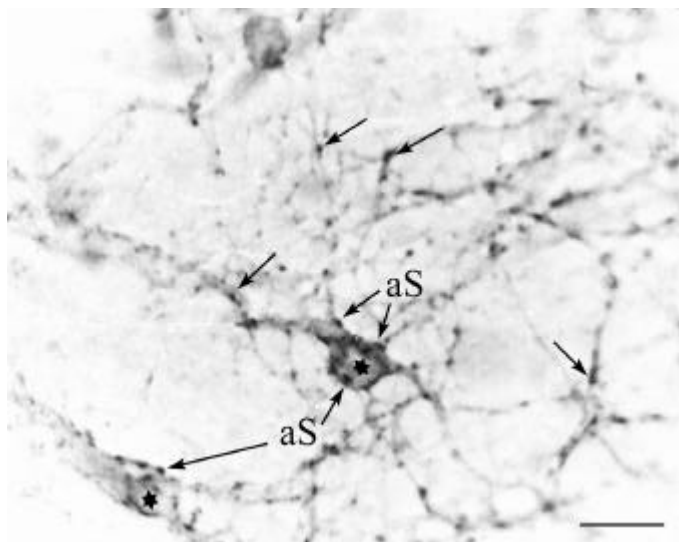
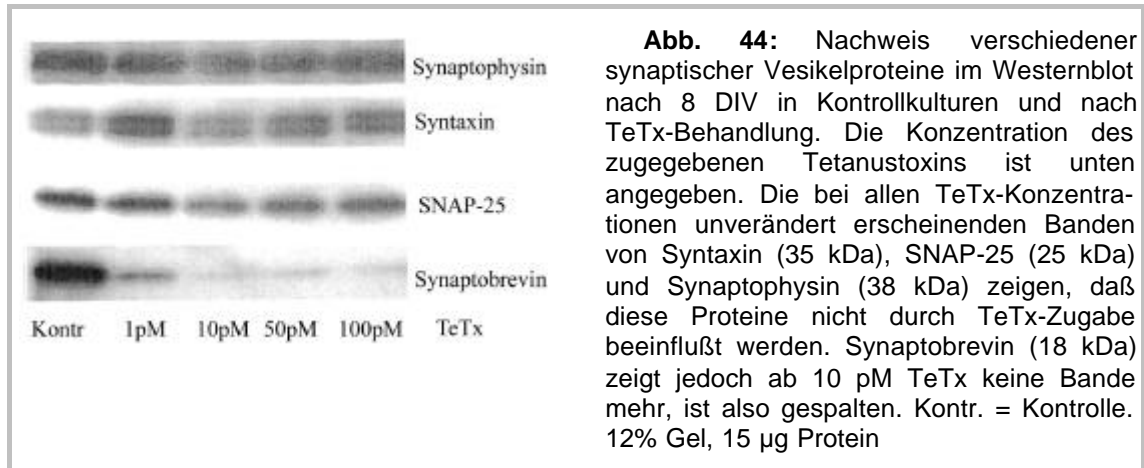


Abb. 43: Einfluß von TeTx auf die Zellkultur nach 12 DIV. Die Neurone sind normal entwickelt. Punktuelle Immunreaktionen sind sichtbar als axosomatische Synapsen (Pfeile mit aS) an den Perikarya (Sterne) und als axodendritische Synapsen (Pfeile) an den Dendriten. Markierung mit anti-rab3A, DAB-Entwicklung. Maßstab = 20 µm

4.3.2 Nachweis der Spaltung von Synaptobrevin im Western-Blot

Ergänzend zu den oben beschriebenen Versuchen wurden Immunoblots von Proben pränataler hippocampaler Neurone nach unterschiedliche Zeiten *in vitro* angefertigt. Die Detektierung synaptischer Vesikelproteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Synaptobrevin hat seine typische Bande im Blot bei 18 kDa. Die konzentrations-abhängige Spaltung durch Tetanustoxin läßt sich im Blot dadurch nachweisen, daß Synaptobrevin nicht mehr detektiert wird. Dies zeigt die Abb. 44. Synaptobrevin stellt sich sowohl in der Kontrolle als auch bei einer Konzentration von 1 pM TeTx im Blot dar. Nach 10 pM TeTx ist die 18 kDa-Bande von Synaptobrevin nicht mehr sichtbar, das heißt Synaptobrevin ist gespalten. Neben Synaptobrevin sind in der Abbildung weitere Proteine dargestellt. Synaptophysin zeigt sich bei 38 kDa unbeeinflusst von der Zugabe des Toxins. Ebenso sind die Proteine SNAP-25 (bei 25 kDa) und Syntaxin (bei 35 kDa) unverändert bei allen TeTx-Konzentrationen sichtbar.



4.3.3 Einfluß der Depletion von Synaptophysin auf die Entwicklung der hippocampalen Zellkultur

Zellkulturen des Hippocampus von Synaptophysin-depletierten Mäusen wurden im Hinblick auf mögliche Veränderungen des Phänotyps der neuronalen Zellen untersucht. Das morphologische Erscheinungsbild der Zellen ergab keine Veränderungen im Vergleich zu unbehandelten Kulturen. Zelldichte und -verteilung, Vernetzungsgrad sowie Morphologie von Perikarya, Axonen und Dendriten unterschieden sich nicht von den Kontrollkulturen. Durch Markierung mit Vesikelproteinen, wie z.B. Synaptobrevin, konnten Synapsen nachgewiesen werden (Pfeil in Abb. 45). Das Verteilungsmuster für Synaptobrevin-spezifische immunreaktive Punkte in der Entwicklung der Synaptophysin-depletierten Kulturen war gleich dem in den Kontrollkulturen. In jungen Stadien (1 bis 6 DIV) fand sich eine diffuse Anfärbung des Perikaryons. In älteren Kulturen färbte sich nur die perinukleäre Kappe aus Golgifeld und endoplasmatischem Retikulum an. Nach 3 DIV waren immunreaktive Punkte auch an den Fortsätzen zu sehen, wie es für die beginnende Ansammlung synaptischer Vesikel zu diesem Zeitpunkt typisch ist (Abb. 45 und Abb. 46).

Eine Zu- oder Abnahme der Immunreaktivität für Synaptobrevin war nicht zu beobachten. Die Immunreaktion für Synaptophysin war negativ. In der Abb. 47 sieht man lediglich eine unspezifische Hintergrundfärbung, aber keine spezifischen Punkte für Synaptophysin. Synaptoporin, ein homologes Protein zu SY, konnte dagegen nachgewiesen werden und zeigte sich auch in Synapsen. (Pfeile in Abb. 48)

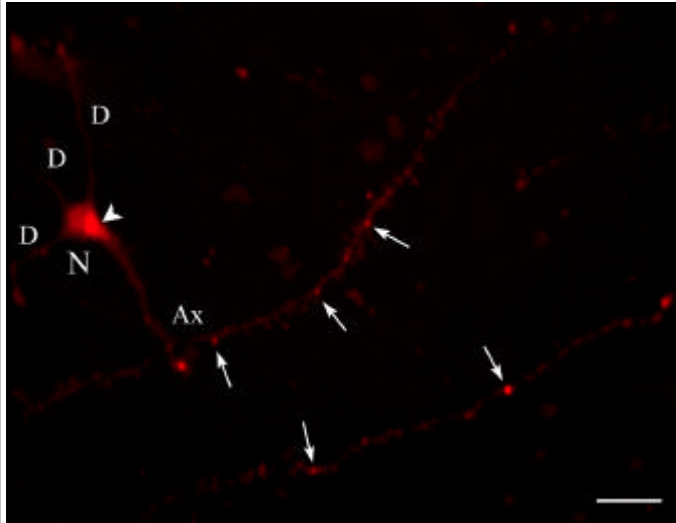


Abb. 45: Darstellung von VAMP-2 bei Synaptophysin-knock-out-Maus nach 6 DIV. Das normal entwickelte Neuron (N) zeigt im Soma perinukleär Immunreaktion (Pfeilspitze). Im Axon (Ax) sind punktuelle Reaktionen zu erkennen, die auf Anhäufungen synaptischer Vesikel hinweisen (Pfeile). Die Dendriten (D) sind schwach gefärbt. Färbung nach Fluoreszenzmethode, Markierung mit anti-VAMP-2. Maßstab = 20 μ m

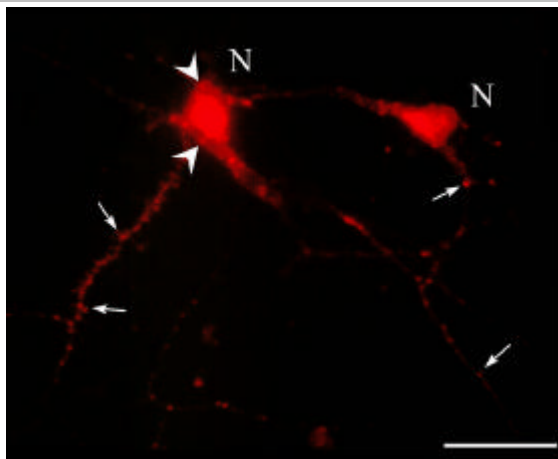


Abb. 46: Darstellung von VAMP-2 bei Synaptophysin-knock-out-Maus nach 6 DIV. Das Perikaryon ist dicht angefärbt. Es sind axosomatische Synapsen sichtbar (Pfeilspitzen). An den Dendriten finden sich wie in Abb.28 zahlreiche immunreaktive Punkte. Färbung nach Fluoreszenzmethode, Markierung mit anti-VAMP-2, N=Neuron, Maßstab = 20 μ m

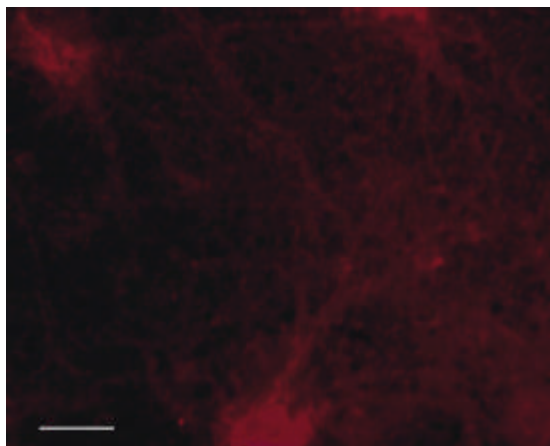


Abb. 47: Fehlende Immunreaktion für Synaptophysin bei Synaptophysin-knock-out-Maus. Lediglich unspezifische Hintergrundfärbung ist zu sehen, spezifische Immunreaktion lässt sich nicht darstellen. 22 DIV, Fluoreszenzmethode, Markierung mit anti-SY, Maßstab = 20 μ m

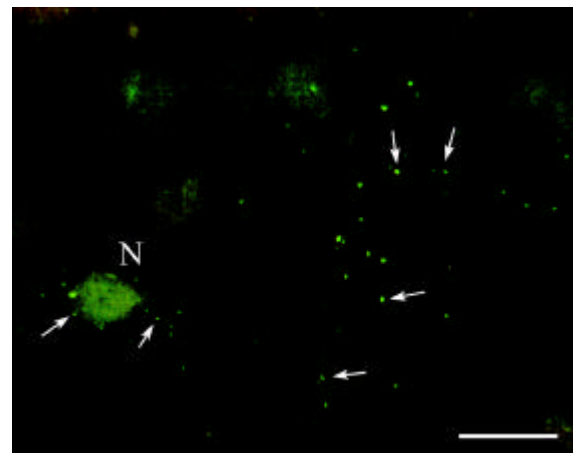


Abb. 48: Darstellung von Synaptoporin nach 13 DIV bei Synaptophysin-knock-out-Maus. Das zur SY-Familie gehörende Protein lässt sich darstellen und zeigt punktuelle Immunreaktionen an Perikaryon (N) und Dendriten (Pfeile). Fluoreszenzmethode, Markierung mit anti-SO, Maßstab = 20 μ m

4.3.4 Einfluß der Depletion von Synaptophysin auf die Differenzierung subzellulärer Strukturen in der hippocampalen Zellkultur

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Kulturen von Synaptophysin-knock-out-Mäusen konnten sowohl bei jungen als auch bei älteren Stadien keine Unterschiede zu den normalen Kontrollkulturen festgestellt werden. Synapsen wurden in derselben zeitlichen Abfolge und mit gleichen morphologischen Strukturen ausgebildet. Die Abb. 49 zeigt eine axosomatische Synapse. Man sieht präsynaptisch clusterförmig angeordnete synaptische Vesikel (Pfeile) und den synaptischen Spalt. Ein Mitochondrium, Neurotubuli und ein Ausschnitt des Nucleus mit doppelter Kernmembran sind zu sehen.

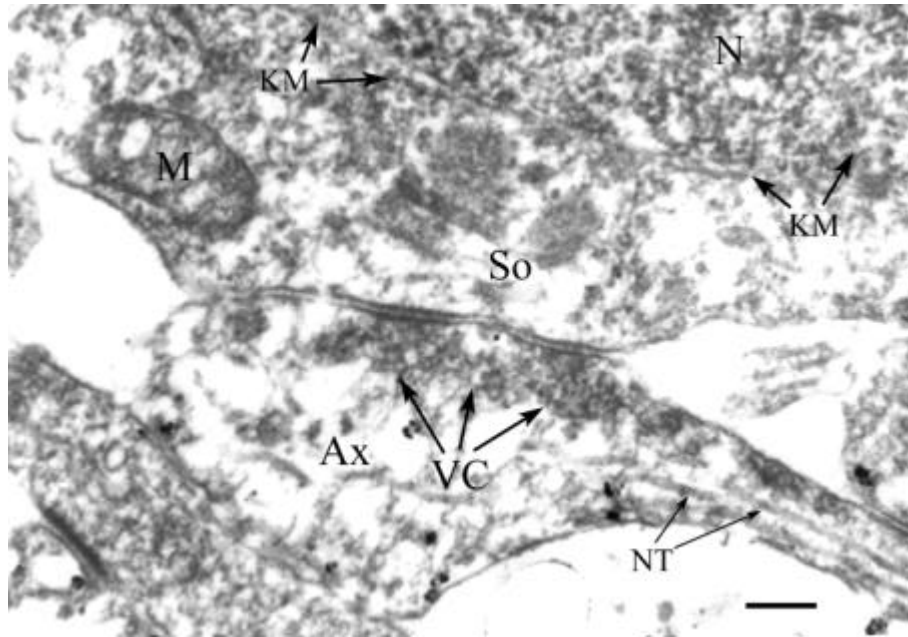
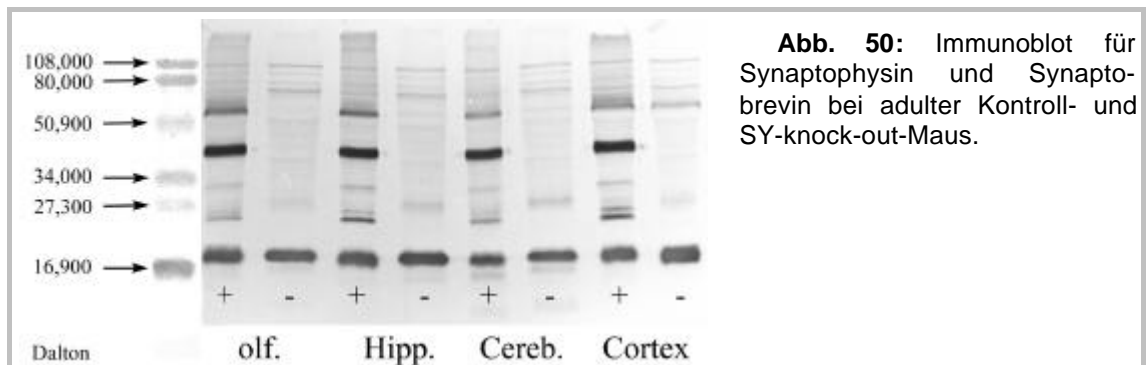


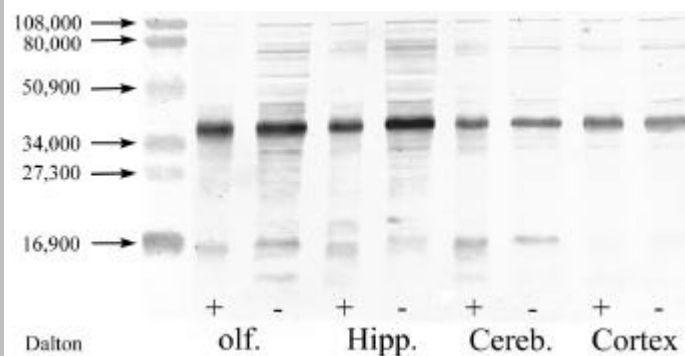
Abb. 49: Elektronenmikroskopisches Bild nach 13 DIV von SY-knock-out-Maus. An der hier abgebildeten axosomatischen Synapse sind deutlich clusterförmige präsynaptische Anlagerungen von synaptischen Vesikeln (VC= Vesikelcluster) zu sehen. Im Axon (Ax) finden sich Neurotubuli (NT). Im Soma (SO) ist der Kern (N) mit seiner doppelten Membran (KM) abgrenzbar. Ein Mitochondrium (M) ist zu sehen. Die vereinzelten schwarzen Punkte stellen Immunreaktionen nach Markierung mit anti-SNAP25 dar. Maßstab = 0,28 µm

4.3.5 Einfluß der Synaptophysin-Depletion im Western-Blot

Mehrere Hirnabschnitte der Synaptophysin-knock-out-Maus wurden homogenisiert und für den Immunoblot aufgearbeitet. Anschließend wurde versucht, Synaptophysin zu detektieren. Dabei konnte festgestellt werden, daß Synaptophysin nicht in den Geweben vorhanden ist. Im Blot der Abb. 50 ist jeweils für die Regio olfactoria, den Hippocampus, das Cerebellum und den Cortex der adulten Maus ein Vergleich zwischen Kontrollmaus und Synaptophysin-depletierter Maus gezeigt. Die Bande bei 38 kDa für Synaptophysin ist bei der knock-out-Maus nicht sichtbar. Bei 18 kDa ist in der Abbildung zusätzlich die Synaptobrevin-Bande zu sehen. Sie zeigt bei Kontroll- und knock-out-Maus keine Veränderung. Die Synaptophysin-Depletion hat also keinen Einfluß auf Synaptobrevin. Das zu Synaptophysin homologe Protein Synaptoporin weist im Blot eine Bande bei 37 kDa auf. Wie aus der Abb. 51 ersichtlich ist, zeigt sich diese Bande sowohl in der Kontrolle als auch bei Synaptophysin-Depletion.



Für verschiedene Hirnabschnitte (olf.= Regio olfactoria, Hipp.= Hippocampus, Cereb.= Cerebellum, Cortex) sind hier bei Kontrolle (+) und Synaptophysin-Depletion (-) Immunoblots für Synaptophysin (38 kDa) und Synaptobrevin (18 kDa) dargestellt. Während die 18 kDa-Bande unbeeinflusst sichtbar ist, fehlt die 38 kDa-Bande bei der knock-out-Maus. Der von Synaptophysin und Synaptobrevin gebildete Komplex von 56 kDa ist ebenfalls bei der knock-out-Maus nicht sichtbar.



Die Bande des zu Synaptophysin homologen Proteins ist bei 37 kDa zu sehen. Sie tritt sowohl in der Kontrolle (+) als auch bei SY-Depletion (-) auf. Der Blot wurde von verschiedenen Hirnabschnitten angefertigt (Erklärung bei Abb. 50)

4.4 Morphometrische Messungen

4.4.1 Einfluß der Synaptobrevin-Spaltung durch Tetanustoxin auf das Faserwachstum

Um zu verifizieren, ob die Inaktivierung von Synaptobrevin durch Tetanustoxin das Wachstum von Dendriten oder Axonen in der Zellkultur beeinflusst, wurden nach 2 DIV und 6 DIV morphometrische Messungen an hippocampalen Neuronen durchgeführt. Dazu wurden Zellkulturen fixiert, nach der DAB-Methode mit anti-MAP2 gefärbt und anschließend unter Verwendung der Phasenkontrastmikroskopie zur Darstellung der Axone fotografiert. Die angefertigten Bilder für Kontrolle (Kulturen ohne TeTx-Zugabe) und Versuch (Konzentration von 1nM TeTx) wurden nach dem Doppelblind-Prinzip ausgewählt. Bei den Kulturen, die nach 2 DIV fixiert wurden, wurde das Tetanustoxin nach 2 h zugegeben, bei den 6 DIV alten Kulturen nach 48 h.

Zur Erfassung der Meßdaten wurde das Programm „Videoplan“ der Firma Kontron (Eching, Deutschland) verwendet. Den Dendriten und Axonen der Zellen wurden im voraus verschiedene Ordnungen zugewiesen, um eine spätere separate Aufarbeitung der Daten zu ermöglichen. Mittels eines Digitalisiertablets wurden dann die Längenmessungen durchgeführt, deren Ergebnisse in Tab. 8 und 9 dargestellt sind. Als Dendritenlänge wird die durchschnittliche Länge des gesamten Dendriten mit allen Verzweigungen bezeichnet. Die morphometrische Messung startete jeweils an den Abgängen der Dendriten vom Soma der Zelle. Die Anzahl basaler Dendriten bezeichnet die vom Soma der Zelle direkt abzweigenden Dendriten. Als Axonlänge wird die Länge des Axons mit allen Verzweigungen bezeichnet. Wiederum erfolgte die Messung ab Abgang des Axons vom Zelleib. Die Unterscheidung von Axon und Dendriten war durch Markierung mit dem dendritischen Markerprotein MAP2, welches die Axone ungefärbt läßt, möglich. Die Axone wurden durch Anwendung der Phasenkontrast-mikroskopie sichtbar.

Die Angabe der Meßergebnisse in den Tabellen erfolgt für n = Stichprobengröße als Mittelwert mit SEM (*standard error of the mean*).

		Mittelwert	SEM
Kontrolle n = 62	Dendritenlänge (in μm)	32,1425	1,84
	Anzahl basaler Dendriten	4,47	0,19
	Axonlänge (in μm)	172,1256	9,30
TeTx n = 65	Dendritenlänge (in μm)	29,6375	1,25
	Anzahl basaler Dendriten	5,06	0,19
	Axonlänge (in μm)	153,9584	8,71

Tab. 8: Ergebnisse der morphometrischen Messungen bei 2 DIV

		Mittelwert	SEM
Kontrolle n = 17	Dendritenlänge (in μm)	57,0893	6,32
	Anzahl basaler Dendriten	4,53	0,51
	Axonlänge (in μm)	309,0293	34,59
TeTx n = 34	Dendritenlänge (in μm)	54,1422	3,23
	Anzahl basaler Dendriten	4,32	0,18
	Axonlänge (in μm)	264,5747	19,63

Tab. 9: Ergebnisse der morphometrischen Messungen bei 6 DIV

Bei Anwendung des U-Tests nach Mann und Whitney, der für die untersuchten Stichproben als verteilungsunabhängiger Test in Frage kam, zeigten sich folgende Ergebnisse:

Vergleich der Dendritenlänge von Kontrolle und TeTx bei 2 DIV:	p = 0,31
Vergleich der Anzahl basaler Dendriten von TeTx und Kontrolle bei 2 DIV:	p = 0,023
Vergleich der Axonlänge von Kontrolle und TeTx bei 2 DIV:	p = 0,062
Vergleich der Dendritenlänge von TeTx und Kontrolle bei 6 DIV :	p = 0,45
Vergleich der Anzahl basaler Dendriten von TeTx und Kontrolle bei 6 DIV:	p = 0,31
Vergleich der Axonlänge von Kontrolle und TeTx bei 6 DIV:	p = 0,11

Bei Anwendung eines Signifikanzniveaus von $p < 0,01$ für einen hochsignifikanten Unterschied ergibt sich im Vergleich aller Einzelversuche der TeTx-behandelten Kulturen gegen die Kontrollkulturen kein hochsignifikanter Unterschied.

4.4.2 Einfluß der Synaptophysin-Depletion auf das Neuritenwachstum

An hippocampalen Kulturen von Synaptophysin-knock-out-Mäusen wurden ebenfalls morphometrische Messungen durchgeführt, um zu verifizieren, ob die Depletion des synaptischen Vesikelproteins Einfluß auf das Wachstum von Axonen und Dendriten hat. Die Messungen von Dendritenlänge, Axonlänge und Anzahl der primären Dendriten erfolgten an Neuronen nach 2 DIV. Die Angabe der Daten erfolgt für n = Stichprobengröße als Mittelwert mit SEM.

		Mittelwert	SEM
Kontrolle n = 29	Dendritenlänge (in μm)	26,6164	1,78
	Anzahl basaler Dendriten	4,55	0,24
	Axonlänge (in μm)	130,2208	8,05
SY knock-out n = 31	Dendritenlänge (in μm)	33,4361	1,85
	Anzahl basaler Dendriten	5,42	0,29
	Axonlänge (in μm)	128,1390	7,56

Tab. 10: Morphometrische Messungen bei 2DIV

Bei Anwendung des U-Tests nach Mann und Whitney ergeben sich im Vergleich der Stichproben folgende Signifikanzen:

Vergleich der Dendritenlänge von knock-out und Kontrolle :	p = 0,003
Vergleich der Anzahl basaler Dendriten von knock-out und Kontrolle :	p = 0,022
Vergleich der Axonlänge von Kontrolle und knock-out :	p > 0,4

Bei Anwendung eines Signifikanzniveaus von $p < 0,01$ für hochsignifikante Unterschiede ergibt sich, daß die Neurone der Zellkultur der Synaptophysin-knock-out-Maus hochsignifikant längere Dendriten als die der Kontrollkulturen ausbilden.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die primär dissoziierte Zellkultur pränataler hippocampaler Neurone Aufschlüsse über neuronales Wachstum und Differenzierung zu erhalten. Besonderes Interesse galt dabei dem Fortsatzwachstum und der Synaptogenese. Die Rolle der synaptischen Vesikelproteine Synaptophysin und Synaptobrevin bei diesen Differenzierungsvorgängen wurde untersucht.

5.1 Die neuronale hippocampale Zellkultur

Für die Untersuchung von Wachstums- und Reifungsvorgängen neuronaler Zellen *in vitro* ist ein System nötig, das es erlaubt, über einen längeren Zeitraum unter optimalen Bedingungen Neuronen das Wachstum zu ermöglichen. Auch bei Untersuchung und Vermessung einzelner Zellfortsätze ist es wichtig, ein geeignetes Kultursystem zu nutzen. Dabei sollte gewährleistet sein, daß zum einen die Entwicklung der neuronalen Zellen unter den *in vitro* gegebenen Bedingungen ungehindert erfolgen kann und zum anderen die gezielte Darstellung von morphologischen und immunhistologischen Charakteristika zu jedem Zeitpunkt möglich ist. Ob Zell-, Explantat- oder slice-Kulturen verwendet werden, ist bei *in vitro*-Systemen von der Fragestellung und der Auswertungsmethode abhängig. Jedes System hat Vor- und Nachteile, die bei der Versuchsplanung berücksichtigt werden müssen. Während primäre Zellkulturen Untersuchungen an völlig isolierten Zellen erlauben, ist in Explantatkulturen oder Slices noch eine organotypische Zusammensetzung gegeben [5], die für andere Fragestellungen Voraussetzung ist.

Das von Banker und Cowan 1977 entwickelte *in-vitro*-System der hippocampalen Einzelzellkultur [1] wurde in weiterentwickelter Form [100] für die Versuche der vorliegenden Arbeit verwendet. Banker und Cowan nahmen Hippocampi der embryonalen Ratte und stellten nach Aussaat der Zellen auf Polylysin-behandelten Glasoberflächen fest, daß eine Adhäsion neuronaler Zellen nach 10min bis 2h erfolgte. Es kam kaum zur Reaggregation der Zellen [1]. Dieses Anheftungsmuster der Zellen war auch bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kulturen vorhanden. Die neuronale Zellkultur bietet den Vorteil, daß Axone und Dendriten isoliert untersucht werden können. In der hippocampalen Zellkultur entwickeln Axone meist präsynaptische und Dendriten vorwiegend postsynaptische Strukturen. Das entspricht der Situation *in situ* [4,17]. Diese spezifischen synaptischen Strukturen zeichnen die Zellkultur auch gegenüber neuronalen Zelllinien, wie z.B. PC12-Zellen, aus [22].

Die fetale hippocampale Zellkultur stellt also ein etabliertes Modell dar, um frühe Wachstums- und Reifungsvorgänge zentraler Neurone unter mit *in situ* vergleichbaren Bedingungen beobachten zu können. Deshalb wurde die neuronale hippocampale Zellkultur in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchen genutzt.

Die morphologische Differenzierung der hippocampalen Zellkultur während der Entwicklung wurde in der vorliegenden Arbeit dargestellt. Zwei charakteristische Zelltypen (Körner- und Pyramidenzellen) konnten nachgewiesen werden, wobei sich die Körnerzellen durch die Verzweigungsart ihrer Dendriten in zwei Typen einteilen ließen. Dieses Differenzierungsmuster stimmt mit Beobachtungen *in situ* anderer Arbeitsgruppen überein (Übersicht in [92]). Die Ausbildung charakteristischer Zelltypen auch *in vitro* ist daher wahrscheinlich ein intrinsischer Prozeß hippocampaler Neurone. Die entwicklungsabhängige Differenzierung ultrastruktureller Elemente wurde an elektronenmikroskopischen Bildern beschrieben. Zellorganellen, wie Mitochondrien, Golgi-Apparat, Neurotubuli, Ribosomen und Endosomen, sowie die strukturellen Mechanismen der Synaptogenese wurden dargestellt. Wachstumsvesikel, Axonbündelungen, Myelinisierung von Axonen und die Ausbildung von Moosfaserboutons waren nachweisbar. Die beschriebenen Charakteristika sind mit Untersuchungen zahlreicher Arbeitsgruppen vergleichbar [43,23,92,100]. Daher kann angenommen werden, daß sich die für diese Arbeit verwendeten neuronalen Zellkulturen normal entwickelt haben.

5.2 Fortsatzwachstum und neuronale Polarität in der hippocampalen Zellkultur

Wachstum und Fortsatzdifferenzierung in hippocampalen Zellkulturen waren Gegenstand der Arbeit von Dotti und Mitarbeitern 1988 [2]. Sie teilten die neuronale Entwicklung in Stadien ein, die bis heute Gültigkeit haben und auch in der vorliegenden Arbeit nachvollzogen werden

konnten. Nach Aussaat der Zellen bilden sich rund um den Zellkörper Lamellipodien (Stadium 1), die sich bewegen und Aktinfilamente enthalten. Diese kleinen Scheinfüßchen kommen wahrscheinlich durch Adhäsionsvorgänge am Objektträger zustande, denn sie sind *in situ* nicht beobachtet worden. Dann wachsen kurze Fortsätze aus (Stadium 2), die parallel angeordnete Mikrotubuli und growth cones aufweisen. Im Stadium 3 nach 1 bis 2 DIV beginnt einer der Fortsätze plötzlich mit hoher Geschwindigkeit zu wachsen und formiert sich zum Axon des Neurons. Dotti hat eine etwa fünffache Wachstumsgeschwindigkeit des Axons gegenüber den Dendriten ermittelt, die in den ersten 4 DIV keine signifikante Verlängerung zeigen. Nach 4 DIV beginnen die Dendriten der hippocampalen Neurone mit signifikantem Wachstum (Stadium 4). Um diese unterschiedlichen Wachstumsvorgänge zu erfassen, wurden die morphometrischen Messungen der vorliegenden Arbeit bei 2 DIV und 6 DIV durchgeführt.

Das anfängliche Auswachsen kleiner Fortsätze, die noch keine Unterscheidung von Axon oder Dendrit zulassen, wird anscheinend durch das Zusammenwirken von Aktin und Mikrotubuli unter Kontrolle verschiedener Proteine wie GAP43 und pp60 reguliert. Kelly und Grote beschrieben 1993 einen möglichen Weg des Neuritenwachstums [20]. Dabei formen Aktinmoleküle nach Anstieg von Ca^{2+} oder anderen Signalmolekülen die Lamellipodien, an denen entlang Mikrotubuli stabilisiert werden. Membranen mit neu synthetisierten Proteinen wandern dann zum distalen Pol der Mikrotubuli und akkumulieren dort. Die Membranstrukturen fusionieren mit der Membran des Wachstumskolbens und tragen so zum Fortsatzwachstum bei. Die Proteine GAP 43 und pp60 beeinflussen das Neuritenwachstum, scheinen aber nicht essentiell dafür zu sein (Übersicht in [20]). Neu synthetisierte Membranproteine könnten aber auch entlang des gesamten Neuriten eingebaut oder vom Soma aus als Komplex in der Membran trans-portiert werden. Daß der Einbau, wie bei Kelly und Grote beschrieben, jedoch überwiegend am growth cone geschieht, bewiesen auch Craig und Mitarbeiter 1995 [21].

Das im Stadium 3 auswachsende Axon unterscheidet sich von den restlichen Fortsätzen nicht nur in der Wachstumsgeschwindigkeit, sondern auch durch einen prominenten Wachstumskolben mit vielen Mikrospiques und hoher Motilität. Die Anlage zur Axonbildung ist in allen Fortsätzen vorhanden und durch bisher unbekannte Mechanismen wird ein Fortsatz ausgewählt [2]. Auch experimentell läßt sich die Axonbildung beeinflussen, wie Dotti und Banker 1987 feststellten [6]. Sie durchschnitten Axone dicht am Perikaryon, kurz nachdem diese ihre deutliche Charakteristik entwickelt hatten, und konnten feststellen, daß danach andere Fortsätze zum Axon wurden. Goslin und Banker erweiterten 1989 diese Untersuchungen und stellten fest, daß die zelluläre Antwort auf die Axondurchtrennung nicht von der Identität der Fortsätze abhängt, sondern von der nach der Axotomie verbleibenden Fortsatzlänge: War ein Fortsatz 10µm länger als andere, so wurde er zum Axon [7].

Auf der Suche nach Ursachen der Zellpolarisierung untersuchten Dotti und Banker 1991 die Positionen von Golgi-Apparat, Zentrosomen und Mikrotubuli in Beziehung zu dem Ort, an dem das Axon entsprang. Es konnten keine bevorzugten Positionen oder Ausrichtungen der Organellen und auch keine anderen konsistenten zytoplasmatischen Veränderungen gefunden werden, die das Axon auswachsen begleiteten [3]. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen fanden Deitch und Banker 1993 ebenfalls keine morphologischen Hinweise darauf, welcher der Neuriten zum Axon wird. Sobald das Axon sich differenzierte, konnten verstärkte Konzentration von Membranen und eine etwa siebenfach niedrigere Ribosomendichte im Axon festgestellt werden [23]. Die Polymerisation von Mikrotubuli verhinderte das Eintreten von Ribosomen ins Axon, wie Baas et al. 1987 feststellten [24]. Die Rolle des Zytoskeletts, insbesondere der Aktinfilamente und Mikrotubuli, und verschiedener regulatorischer Proteine bei den Wachstumsprozessen neuronaler Zellfortsätze wurden auch von Diaz-Nido und Mitarbeitern 1996 diskutiert [8]. Dabei wurden die Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAP-Familie) als Hauptregulatoren der Fasergenese hervorgehoben. Eine wichtige Funktion haben der Mikrotubuli-bündelnde Faktor tau sowie das Protein MAP1, da sie sich selektiv im Axon befinden [20]. Das beim Neuritenwachstum beteiligte Protein GAP 43 akkumuliert nach Auswachsen des Axons im axonalen Wachstumskolben, während seine Konzentration in den anderen Fortsätzen abnimmt [25]. Extrazelluläre Reize wie NGF oder extrazelluläre Matrixmoleküle wie Laminin [45] und Adhäsionsmoleküle scheinen über Triggermechanismen die neuronale Morphogenese zu beeinflussen.

Da stärkeres Wachstum der Dendriten gegenüber der anfänglichen Wachstumsrate erst ab 3 bis 4 DIV festzustellen war, könnte das mit dem Auftreten erster synaptischer Strukturen in Zusammenhang stehen. Doch die Regulierung des Wachstums und der Differenzierung der

Dendriten ist noch unklar. Spezifische Proteine des dendritischen Zytoskelettes wie MAP2, Dystrophin, Ankyrin und Spectrin-Isoformen spielen eine Rolle. Die Mikrotubuli der Dendriten sind antiparallel ausgerichtet, also in beide Richtungen orientiert (proximal und distal), wohingegen Axone nur einseitig (distal) ausgerichtete Mikrotubuli enthalten. Durch Interaktion dendritischer oder axonaler Proteine mit Motorproteinen des Organellentransports entlang der Mikrotubuli wäre ein spezifischer Transport denkbar (Übersicht in [20]). Wie die hier vorgestellten Untersuchungen Synaptophysin-defizienter Zellkulturen zeigen, sind unterschiedliche Regulierungs- und Transportsysteme in Dendriten und Axonen denkbar.

5.3 Rolle synaptischer Vesikelproteine beim neuronalen Wachstum

Eine Beteiligung synaptischer Vesikelproteine beim axonalen Wachstum wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen beschrieben. Das Vesikelmembranprotein Synapsin I ist wahrscheinlich an Wachstumsprozessen beteiligt, da Chin und Mitarbeiter 1995 an Synapsin I – knock-out-Mäusen vermindertes Auswachsen von Neuriten und Axonen feststellen konnten. Außerdem begann die Synaptogenese der Neurone mit zeitlicher Verzögerung [26]. Igarashi und Mitarbeiter belegten 1996, daß plasmamembrangebundenes Syntaxin am axonalen Wachstum beteiligt ist. Das Botulinumneurotoxin C1, welches Syntaxin spezifisch spaltet, blockierte im Experiment die Aktivität der C-Domäne der growth cones. Die Autoren folgerten, daß Syntaxin während der Membranexpansion durch Exozytose mit Synaptobrevin und SNAP-25 entsprechend der SNARE-Hypothese reagiert [13]. Williamson und Neale zeigten an Rückenmarksnurone, daß BoNT/C1 Neuritenwachstum und Synaptogenese inhibiert sowie zytotoxisch wirkt. Die beobachteten Veränderungen traten vorwiegend in prä-synaptischen Terminalen auf und wurden Syntaxin oder Syntaxin und SNAP-25 (da BoNT/C1 auch SNAP-25 spaltet) zusammen zugeschrieben [32]. Auch für SNAP-25 alleine konnte gezeigt werden, daß es bei axonalem Wachstum beteiligt ist. Osen-Sand und Mitarbeiter wiesen 1996 nach, daß die Spaltung von SNAP25 durch Botulinum-neurotoxin A eine Inhibition des Axonwachstums hervorruft und die Synaptogenese verhindert [27]. Durch Einsatz von SNAP-25-antisense-Oligonukleotiden wurde ebenfalls eine Verminderung des Axonwachstums *in vitro* und *in vivo* festgestellt [28]. Williamson und Neale bestritten zwar eine Auswirkung von BoNT/A auf Wachstum und Synaptogenese, konnten diese Behauptung aber auch nicht zufriedenstellend belegen, da keine Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte [32].

Matteoli et al. wiesen durch Markierung mit Antikörpern gegen den luminalen Teil des Vesikelproteins Synaptotagmin nach, daß auch bei dendritischem Wachstum Exo- und Endozytoseprozesse auftreten [15]. Auch die Lokalisation von rab3A an synaptischen Vesikeln in Dendriten und Axon eines sich entwickelnden Neurons [29] spricht für das Auftreten von Exo- und Endozytoseprozessen während des Dendritenwachstums, da rab3A vorwiegend in den der Exozytose vorausgehenden Stadien an synaptische Vesikelmembranen bindet [30,31]. Daher ist es denkbar, daß synaptische Vesikelproteine auch bei dendritischem Wachstum eine Rolle spielen. Grosse et al. bestätigten eine Beteiligung des SNARE-Proteins SNAP-25 am dendritischen Wachstum, da nach Spaltung von SNAP-25 durch BoNT/A vermindertes Fortsatzwachstum nachgewiesen werden konnte [147].

5.3.1 Rolle von Synaptophysin bei Wachstum und Entwicklung der hippocampalen Zellkultur

Die Verteilung und subzelluläre Lokalisation des Vesikelmembranproteins Synaptophysin in der hippocampalen Zellkultur wurde untersucht. Nach der Zellaussaat fand sich die Immunreaktion für das Protein im Perikaryon der Neurone. Nach 2 bis 3 DIV waren Axon und Dendriten schwach angefärbt. Nach 3 bis 4 DIV waren erste immunreaktive Punkte in Varikositäten und Axonterminalen sichtbar. Diese punktuellen Immunreaktionen entsprechen Synapsen, wie elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurde. Fletcher und Mitarbeiter untersuchten 1991 die Verteilung von Synapsin und Synaptophysin in hippocampalen Zellkulturen der Ratte. Sie stellten fest, daß beide Proteine weitgehend kolokalisiert waren. In jungen Stadien (Stadium 3 nach Dotti) befanden sich die Proteine vorwiegend im Axon, dort besonders im growth cone. Beide Proteine fanden sich später in immunreaktiven Punkten an der Dendritenoberfläche, waren also in Synapsen kolokalisiert [14]. Durch ultrastrukturelle Untersuchungen kamen die Autoren zu dem Schluß, daß die Anhäufungen synaptischer Vesikelproteine präsynaptischen Vesikelclustern an Kontaktstellen zwischen Axon und Dendrit bzw. Soma entsprechen. Dies konnte durch Matteoli und Mitarbeiter 1992 bestätigt werden. Sie wiesen zusätzlich nach, daß Vesikel aus diesen Clustern Exo- und Endozytoseprozesse wie synaptische Vesikel *in situ* durchlaufen [15]. Die immunreaktiven Punkte der licht- und fluoreszenzmikroskopischen

Darstellungen der vorliegenden Arbeit entsprechen daher Synapsen. Erste synaptische Strukturen konnten nach 3 DIV nachgewiesen werden.

Die starke Immunreaktion für Synaptophysin im Soma nach der Zellaussaat ging nach etwa 3 bis 6 DIV zurück. Der Bereich des endoplasmatischen Retikulums und des Golgiapparates wies weiterhin Immunreaktionen auf. In älteren Kulturen waren im Perikaryon nur noch sehr schwache Immunreaktionen zu detektieren. Synaptophysin befand sich vorwiegend in axodendritischen und axosomatischen Synapsen, was durch zahlreiche punktuelle Immunreaktionen an Dendriten und Somata gezeigt wurde. Im Immunoblot konnte eine Zunahme des Synaptophysinspiegels im Laufe der Entwicklung gezeigt werden. Diese Befunde lassen sich mit der Zunahme der Proteinbiosynthese erklären. Anfangs wird das Protein stark exprimiert, aber noch nicht sortiert, so daß eine Anreicherung im Soma erfolgt. Nach 3 bis 4 Tagen erfolgt die Sortierung des Proteins, es erscheint spezifisch an Synapsen und die Biosynthese im Soma läßt nach. In älteren Kulturen befindet sich Synaptophysin in zahlreichen Synapsen, daher ist der Gesamtspiegel des Proteins im Blot erhöht.

Schon Jahn et al. 1985, die Erstbeschreiber des Proteins, konnten ebenso wie Wiedemann und Franke 1985 ein ähnliches Verteilungsmuster feststellen [40,41]. Die anfängliche Konzentration des Proteins im Golgiapparat wurde von Tixier-Vidal et al. an Kulturen von Hypothalami der Ratte beschrieben. Die folgende Umverteilung deuteten die Autoren als Hinweis auf einen schnellen Transport vom Golgifeld zu den Axonterminalen [38]. Auch in Zellkulturen von Hypothalami der Maus konnte das beschriebene Verteilungsbild gefunden werden. Dabei zeigte sich, daß während der Synaptogenese der Proteinspiegel etwa um das dreifache steigt [39]. Während die Spiegelhöhung bei anderen Vesikelproteinen, wie z.B. Synapsin, Synaptobrevin und Synaptotagmin, durch eine Verlängerung der Halbwertszeit mit zunehmendem Kulturalter zustande kommt, ist sie bei Synaptophysin durch die Steigerung der mRNA-Translation verursacht, wie Daly und Ziff 1997 herausfanden [42]. Die Halbwertszeit von Synaptophysin bleibt relativ konstant, was nach Ansicht der Autoren dadurch erklärbar ist, daß dessen Produktionsrate mit der Vesikelgenese parallel läuft. Dies deutet auf eine mögliche Beteiligung des Proteins bei der Bildung synaptischer Vesikel hin. Andererseits werden auch in Synaptophysin-defizienten Zellen normale und funktionsfähige Vesikel produziert [43], das Protein scheint also für die Vesikelbildung nicht essentiell zu sein.

Ein bemerkenswerter Befund bei der Untersuchung der hippocampalen Zellkultur war der ultrastrukturelle Nachweis von Synaptophysin in Dendriten. Während im fluoreszenz- und lichtmikroskopischen Bild punktuelle Immunreaktionen für das Protein vorwiegend an den Dendriten zu sehen waren, zeigte das elektronen-mikroskopische Bild das Protein auch im Dendriten. In der axonalen Präsynapse waren alle synaptischen Vesikel mit dem Protein markiert. Im Dendriten zeigten sich vereinzelte Immunreaktionen. Verschiedene Ursachen, wie z.B. regulatorische Funktionen oder Beteiligung bei Transport- und Wachstumsvorgängen, könnten das Vorkommen von Synaptophysin in Dendriten erklären.

Während Fletcher 1991 Synaptophysin in den ersten Entwicklungstagen vorwiegend im distalen Axon lokalisierte [14], wiesen Bergmann et al. 1993 das Protein auch in Dendriten junger Nervenzellen des olfaktorischen Systems nach [46]. Da sich diese Zellen kontinuierlich regenerieren, scheint das Protein bei dendritischen Wachstumsprozessen eine Bedeutung zu haben. Grabs et al. gelang der Nachweis von Synaptophysin in apikalen Dendriten von embryonalen Pyramidenzellen des Hippocampus der Ratte [49]. Auch hier ist eine Beteiligung des Proteins am dendritischen Wachstum denkbar.

Regulierende Funktionen scheint das Protein bei Membranrecyclingprozessen einzunehmen, wie die folgenden Befunde zeigen. In Dendriten und unreifen Axonen finden endozytotische Prozesse entlang der gesamten Plasmamembran statt, in reifen Axonen dagegen nur noch an Präsynapse und Varikositäten [51]. Endozytotisches Material gelangt in ein Netzwerk tubulärer Endosomen, sogenannter early-Endosomen. In Zellen der Phäochromozytom-Zelllinie PC12 ist Synaptophysin im Kompartiment dieser early-Endosomen zu finden [50]. In nicht-neuronalen und nicht-endokrinen Zellen stellten Johnston et al. fest, daß Synaptophysin als fremdes Protein in diesen Zellen in Membrankomponenten akkumuliert, die beim endozytotischen Membranrecycling beteiligt sind [52]. Die Kolokalisation mit Transferrinrezeptoren in Perikarya und proximalen Dendriten, aber nicht in Axonen hippocampaler Neurone, ließ Cameron und Mitarbeiter 1991 ebenfalls zu dem Schluß kommen, daß Synaptophysin beim Membranrecycling beteiligt sein muß [48]. Mundigl et al. stützten diese Vermutung, indem sie

die Kolokalisation mit Transferrinrezeptoren, die als Marker der early-Endosomen gelten, als für junge Dendriten spezifischen Prozeß im Rahmen von Membranbiogenese und –recycling zur Diskussion stellten [47].

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Lokalisation von Synaptophysin in Dendriten ist also, übereinstimmend mit den erwähnten Untersuchungen, höchst-wahrscheinlich auf eine Beteiligung des Proteins bei Membranrecyclingvorgängen zurückzuführen. Während der Membranbiogenese in Dendriten und Axonen könnte dem Protein daher auch eine Rolle beim Wachstum zukommen. Um das herauszufinden, wurden Untersuchungen an Synaptophysin-depletierten Mäusen durchgeführt. Das komplette Fehlen des Proteins sowohl in Homogenisaten verschiedener Hirnabschnitte als auch in immunmarkierten hippocampalen Zellen wurde nachgewiesen. Von Hippocampi der Synaptophysin-knock-out-Mäuse wurden Zellkulturen angefertigt und licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei konnten keine Unterschiede zu Kontrollkulturen festgestellt werden. Die Entwicklung der Zellen vollzog sich in einer mit den Stadien nach Dotti [2] übereinstimmenden Weise. Synapsen wurden ausgebildet. Da sich eine in Frage kommende regulative Funktion von Synaptophysin besonders in jungen Entwicklungsstadien der Neurone bemerkbar machen würde, wurden nach 2 DIV Längenmessungen der Fortsätze durchgeführt. Nach Dotti weisen die Dendriten nach 2 DIV noch keine signifikante Wachstumsänderung auf, das Axon ist zu diesem Zeitpunkt von den Dendriten abgrenzbar und befindet sich in seiner Wachstumsphase (Stadium 3). Durch statistische Analyse der Meßergebnisse wurde bei den Dendriten der Synaptophysin-defizienten Maus gegenüber dem Wildmaustyp ein signifikant erhöhtes Längenwachstum festgestellt. Mit leichter Signifikanz wurden mehr primäre Dendriten ausgebildet. Das Wachstum der Axone war dagegen nicht verschieden. Dieses Ergebnis läßt auf eine regulierende Funktion des Proteins beim Dendritenwachstum schließen.

Einer essentiellen Rolle des Proteins stehen allerdings mehrere Dinge entgegen. Eshkind und Leube entwickelten 1995 eine Synaptophysin-defiziente Maus und untersuchten Synaptogenese, Expression synaptischer Proteine und das morphologische Bild. Sie konnten keine Unterschiede zur Wildtypmaus feststellen. Die defizienten Mäuse entwickelten sich regelrecht, zeigten normales Verhalten und waren fortpflanzungsfähig [43]. Auch McMahon und Mitarbeiter konnten bis auf einen leichten Abfall der Synaptobrevin-Konzentration keine Auswirkungen der Synaptophysin-Depletion feststellen [55].

In Anbetracht der nahezu ubiquitären synaptischen Verteilung des Proteins sind diese Ergebnisse erstaunlich. Synaptophysin ist Teil einer Proteinfamilie, der auch Synaptoporin [54], Pantophysin [53] und Synaptogyrin [57] angehören. Daher ist es denkbar, daß diese Proteine bei Fehlen Synaptophysins kompensatorische Funktionen wahrnehmen. Synaptoporin hat allerdings ein anderes Verteilungsmuster als Synaptophysin [56], das auch in der defizienten Maus erhalten bleibt. Dies konnte von Eshkind und Leube [43] und in dieser Arbeit gezeigt werden. Gleiches gilt für Pantophysin [43] und Synaptogyrin [55]. Auch die Menge vieler anderer synaptischer Proteine erscheint in der defizienten Maus unverändert [55,43, diese Arbeit]. Dennoch ist nicht auszuschließen, daß vielleicht noch unentdeckte verwandte oder nicht verwandte Proteine Funktionen von Synaptophysin übernehmen. Eine weitere Erklärung für die Folgelosigkeit der Synaptophysin-Depletion könnte sein, daß das Protein funktionell wirkungslos ist. Gegen diese Vermutung spricht die ubiquitäre Verteilung des Proteins sowohl in neuronalen als auch in neuroendokrinen Geweben. Die spezifische Lokalisation an synaptischen Vesikeln und in bestimmten am Membranrecycling beteiligten Kompartimenten läßt funktionelle Beteiligung an Exozytoseprozessen (Transmitterfreisetzung) oder Endozytosevorgängen (Membran-recycling) vermuten. Alder und Mitarbeiter wiesen durch Injektion von Antikörpern gegen Synaptophysin [59] und durch antisense-RNA-Experimente [58] eine Inhibition der Exozytose nach. Dieser Nachweis konnte von McMahon et al. aber nicht nachvollzogen werden [55]. Synaptophysin scheint bei Exozytoseprozessen nicht direkt beteiligt zu sein, auch wenn frühere Arbeiten dem Protein eine Rolle als Membrankanal [60] oder Kalzium-Sensor [44] zusprachen. Über eine Interaktion von Synaptophysin mit dem Plasmamembranprotein Physophilin könnte zwar ein Membrankanal gebildet werden [63], jedoch scheint einer solchen Fusionspore zumindest bei der regulierten Exozytose keine wichtige Stellung zuzukommen. Im Fusionskomplex aus Syntaxin, SNAP-25 und Synaptobrevin (Tertiärkomplex) kommt Synaptophysin nicht vor [61] und spielt daher bei der Membranfusion während der Exozytose keine direkte Rolle. Als Kalziumsensor fungiert das vesikuläre Membranprotein Synaptotagmin [65,64]. Eine regulative Funktion vor oder während der Membranfusion kann Synaptophysin dennoch zukommen, da es mit dem synaptischen Vesikelprotein Synaptobrevin an der

Vesikelmembran einen Komplex bildet. Calakos und Scheller wiesen diesen Komplex von 56 kDa 1994 nach [61]. Washbourne und Mitarbeiter zeigten, daß die Isoform Synaptobrevin II diesen Komplex bildet, wobei der N-terminale zytosolische Anteil von Synaptobrevin beteiligt sein sollte [62]. Edelman et al. favorisierten eine Bindung unter Beteiligung der transmembranen Domänen beider Proteine. Auch die Isoformen Synaptobrevin I und Cellubrevin konnten den Komplex mit Synaptophysin bilden. War Synaptobrevin in diesem Komplex gebunden, so war es für Bindungen mit Syntaxin oder SNAP-25 sowie die Bildung des Tertiärkomplexes nicht verfügbar [66]. Daher könnte Synaptophysin regulierend in die Bildung des Fusionskomplexes eingreifen und eine Bindung von Synaptobrevin an Syntaxin und SNAP-25 zeit- oder stimulusabhängig steuern. Dies kann besonders in Hinsicht auf Langzeitpotenzierung oder synaptische Plastizität von Bedeutung sein.

Unter der Voraussetzung, daß bei regulierter und konstitutiver Exozytose der Fusionskomplex der genannten Proteine beteiligt ist, könnte Synaptophysin auch bei Wachstumsvorgängen regulierend eingreifen. Das stärkere Dendritenwachstum in der hippocampalen Zellkultur der Synaptophysin-defizienten Maus wäre dadurch erklärbar, allerdings bleibt offen, warum dann nicht auch für das axonale Wachstum ähnliche Ergebnisse gefunden wurden. Igarashi und Mitarbeiter konnten außerdem in isolierten growth-cone-Partikeln den Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex nicht nachweisen, Synaptophysin alleine war aber in growth cone-Vesikeln angereichert [67]. Auch Becher et al. wiesen nach, daß der Komplex erst postnatal nachweisbar ist und demnach als Indikator der Reifung synaptischer Vesikel angesehen werden kann [68]. Wie Prekeris und Terrian 1997 zeigten, kann Brain Myosin V, ein Motorprotein synaptischer Vesikel, das mit dem Zytoskelett in Wechselwirkung tritt, Ca^{2+} -abhängig an den Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex binden. Der so gebildete Transportkomplex könnte in der Lage sein, synaptische Vesikel von präsynaptischen Clustern an die aktive Zone zu transportieren [69].

In der neuronalen Wachstumsphase scheint Synaptophysin alleine oder über andere Mechanismen regulatorisch wirksam zu sein, während der Komplex mit Synaptobrevin erst postnatal eine Rolle spielt. Regulierende Funktionen bei Membranrecycling und konstitutiver Exozytose sind daher eine Aufgabe von Synaptophysin während des neuronalen Wachstums, wohingegen das Protein bei regulierter Exozytose und Transmitterfreisetzung über die Interaktion mit Synaptobrevin Einfluß nimmt.

5.3.2 Rolle von Synaptobrevin bei Wachstum und Entwicklung der hippocampalen Zellkultur

In der neuronalen hippocampalen Zellkultur wurde die Verteilung des synaptischen Vesikelpoteins Synaptobrevin untersucht. Anfangs fand sich die Immunreaktion vorwiegend im Soma. Nach 3 bis 4 DIV waren immunreaktive Punkte im Axon und an den Dendriten sichtbar. In späteren Stadien waren zahlreiche punktuelle Immunreaktionen zu sehen, die im elektronenmikroskopischen Bild axodendritischen und axosomatischen Synapsen entsprachen. Erstaunlicherweise waren in den Präsynapsen nicht alle synaptischen Vesikel mit dem Antikörper markiert, wie es bei Synaptophysin gefunden wurde.

In Dendriten konnte Synaptobrevin, im Gegensatz zu Synaptophysin, nicht nachgewiesen werden. Wenn auch die generelle Verteilung beider synaptischer Vesikelpoteine übereinstimmt, so scheinen subzellulär differente Lokalisationen vorzuliegen, die auf unterschiedliche Funktionen beider Proteine schließen lassen.

Trimble [94] und Baumert [70] stellten bei der Entdeckung des Proteins in neuronalem Gewebe eine spezifische Lokalisation an synaptischen Vesikeln fest. Innerhalb des neuronalen Systems fand man das Protein vorwiegend in Nervenenden. Außerhalb wurde Synaptobrevin in endokrinen Zellen und Zelllinien, u.a. von Pankreas und Nebennierenmark, nachgewiesen [70]. Ahnert-Hilger und Mitarbeiter beschrieben an hypothalamischen und cerebellären Kulturen der Maus ein Verteilungsmuster, das dem für die hippocampale Zellkultur gleichkommt [71]. Synaptobrevin existiert im neuronalen und neuroendokrinen Gewebe in zwei Isoformen, die hoch homolog zueinander sind, aber von zwei verschiedenen Genen stammen [79]. Vorwiegend in nicht-neuronalen Zellen existiert die Isoform Cellubrevin [72]. Synaptobrevin I und II weisen im peripheren Nervensystem eine unterschiedliche Verteilung auf, wobei die Isoform I vor allem in Motoneuronen vorkommt, während Synaptobrevin II in adrenergen und sensorischen Neuronen lokalisiert ist [73]. Im zentralen Nervensystem ist eine ähnliche funktionell orientierte Verteilung gefunden worden [80].

Die selektive Lokalisation an synaptischen Vesikeln läßt das Protein als ein Schlüsselprotein der regulierten Exozytose erscheinen. Hinweise darauf ergaben sich auch aus der Tatsache, daß die exozytosehemmende Wirkung von Tetanustoxin (TeTx) und Botulinumneurotoxin (BoTx) B auf der selektiven Spaltung von Synaptobrevin beruht [74]. Die Botulinumneurotoxine D, F und G spalten ebenfalls Synaptobrevin und inhibieren damit die Exozytose [75,76,77]. Die spezifische Toxinwirkung konnte auch *in vivo* nachgewiesen werden [78]. Synaptobrevin bildet mit Syntaxin und SNAP-25 einen Komplex [81], der sich inzwischen als zentraler Bestandteil der regulierten Exozytose etabliert hat (siehe auch Einleitung). Da Synaptobrevin für die regulierte Exozytose essentiell erscheint, stellt sich die Frage, ob das Protein auch bei konstitutiver Exozytose und Wachstum mitwirkt.

In der vorliegenden Arbeit wurden an hippoamapalen Zellkulturen die Auswirkungen der Spaltung von Synaptobrevin durch Tetanustoxin auf das neuronale Wachstum untersucht. Um toxische und unspezifische Wirkungen von Tetanusneurotoxin auszuschließen, wurde die minimal wirksame Konzentration des Toxins in der hippocampalen Zellkultur ermittelt. Bei einer Konzentration von 100pM TeTx war der größte Teil von Synaptobrevin gespalten, bei 1nM TeTx war die Spaltung auch intrazellulär nachweisbar. Dieser Konzentrationsbereich entspricht auch dem anderer Arbeitsgruppen [71] und schließt unspezifische Wirkungen, etwa über die Spaltung von Cellubrevin oder die Beeinflussung von Ionenkanälen, nahezu aus. Die mit TeTx behandelten neuronalen Zellkulturen unterschieden sich morphologisch nicht von den Kontrollkulturen. Synapsen wurden ausgebildet. Die synaptischen Vesikelproteine Syntaxin, SNAP-25 und Synaptophysin waren nachweisbar. Durch morphometrische Messungen sowohl nach 2 als auch nach 6 DIV konnte gezeigt werden, daß die funktionelle Defizienz des Proteins keinen Einfluß auf Dendriten- oder Axonwachstum hat. Die Wachstumsgeschwindigkeiten bei TeTx-behandelten und Kontrollkulturen entsprachen in etwa den durch Videomikroskopie ermittelten Werten von Dotti [2].

Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein. An hypothalamischen und cerebellären Kulturen fanden sich nach Behandlung mit TeTx ebenfalls keine morphologischen Veränderungen oder Abweichungen der Expression anderer synaptischer Vesikelproteine, obwohl die Neurone nicht zur stimulierten Sekretion fähig waren [71]. Auch in Kulturen corticaler und hippocampaler Neurone der Ratte verursachte TeTx im Vergleich zu anderen Toxinen zwar die stärkste Inhibition spontaner und induzierter Transmitterfreisetzung, hatte aber keinen Einfluß auf neuronales Wachstum, Zellzahl und Synaptogenese [27]. Sweeney et al. beschrieben, daß die Synaptobrevin-Inaktivierung durch TeTx bei *Drosophila* die synaptische Transmission eliminiert, aber keinen Einfluß auf die Genese der neuromuskulären Endplatte hat [82]. Deitcher fand sogar in Synaptobrevin-defizienter *Drosophila* eine unbeeinträchtigte Ausbildung der neuromuskulären Verbindung [85]. Die morpho-metrischen Messungen der vorliegenden Arbeit untermauern diese Beobachtungen und lassen schlußfolgernd die Feststellung zu, daß Synaptobrevin als Schlüsselprotein der regulierten Exozytose keine Rolle bei der Membranexpansion während des Wachstums spielt. Ähnliches wurde für das vesikuläre Membranprotein Synaptotagmin herausgefunden [83].

Daher scheint es so, als würden Mechanismen der regulierten Exozytose nicht signifikant zu axonalem und auch dendritischem Wachstum beitragen. Dem widersprechen allerdings die Beobachtungen, daß die Inaktivierungen von SNAP-25 durch BoTx/A und Syntaxin durch BoTx/C zur Inhibition axonalen und dendritischen Wachstums führen, wie weiter oben beschrieben wurde [13,28,27,32]. Dies eröffnet zwei mögliche Varianten des exozytotischen Wachstums. Zum einen wäre die Interaktion von Syntaxin und/oder SNAP-25 mit TeTx-insensitiven Isoformen von Synaptobrevin denkbar. Solche Isoformen sind kürzlich für Synaptobrevin nachgewiesen worden. Auch für Syntaxin und SNAP-25 fand man toxinresistente Isoformen [84]. Damit konnten toxininsensitive Exozytosevorgänge nicht-neuronaler Zellen, wie die apikale Exozytose bei Epithelzellen, erklärt werden. Eine Funktion solcher Isoformen bei neuronalem Wachstum wäre theoretisch denkbar. Die zweite Variante wäre, daß Synaptobrevin oder Isoformen als v-SNAREs im Sinne der SNARE-Hypothese (siehe Einleitung) während der Fusion von Membranen beim Wachstum gar nicht beteiligt sind. Die vorwiegend plasmamembrangebundenen Proteine SNAP-25 und Syntaxin, die sogenannten t-SNAREs, sind auch an der Vesikelmembran in signifikanten Mengen vorhanden [88,87], so daß die Unterteilung in v- und t-SNAREs nicht für alle Interaktionen dieser Proteine sinnvoll erscheint. Hinweise auf v-SNARE-unabhängige Fusionsprozesse ergaben sich durch die Erforschung homotypischer Fusion endoplasmatischer Membranen in Hefe. Patel und Mitarbeiter stellten fest, daß dabei Fusionen durch reine t-t-SNARE-Interaktion stattfinden [89].

Auch Nichols et al. wiesen bei Hefeendosomen t-SNARE-vermittelte Fusionen nach, die allerdings nicht so effizient waren, wie Fusionen durch v- und t-SNARE-Interaktion [90]. Daher wäre es denkbar, daß die Fusion von Wachstumsvesikeln bzw. Vesikeln, die zukünftige Membranbestandteile enthalten, mit der Plasmamembran t-SNARE-vermittelt abläuft. Die regulierte Exozytose zur Transmitterfreisetzung benötigt dagegen zusätzlich v-SNAREs und weitere regulative Mechanismen.

Die Rolle Synaptobrevins bei der regulierten Exozytose bleibt indes unbestritten, wenn auch die genaue zeitliche Abfolge von Docking und Fusion sowie die exakte Wirkung des Proteins noch nicht vollständig geklärt sind. Hunt et al. fanden 1994 heraus, daß nach TeTx-Behandlung die Zahl der gedockten Vesikel in der Präsynapse anstieg, aber keine Fusion stattfand. Daher muß Synaptobrevin eine Rolle zwischen Docking und Fusion zukommen [86]. Extrakte von gespaltenem SNAP-25 und Synaptobrevin sind in der Lage, mit Syntaxin, NSF und α -SNAP den 20S-Komplex zu bilden. Beide nach der Spaltung von Synaptobrevin durch TeTx entstehenden Proteinfragmente (N-terminal 11kDa und C-terminal 7 kDa) können im 20S-Komplex nachgewiesen werden [91]. Damit erklärt sich auch die Beobachtung von Hunt [86], daß sich die exozytose-hemmende Wirkung von TeTx nach dem Dockingprozeß entfalten muß. Möglich wäre dies, indem beide Synaptobrevin-Fragmente nach der Spaltung z.B. in geknicktem Zustand vorliegen und das Protein somit funktionell inaktiviert ist [91]. Die in einer aktuellen Arbeit von Poirier et al. vorgeschlagene Extension des Gesamtkomplexes als Voraussetzung zur Membranfusion [95] könnte dann nicht stattfinden.

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der mit Synaptobrevin-Antikörper markierten hippocampalen Neurone fiel auf, daß Synaptobrevin nicht an allen synaptischen Vesikeln in der Präsynapse zu sehen war. Eine Erklärung dafür ist schwierig. Der verwendete Antikörper (clone 69.1) richtet sich gegen die ersten 10 Aminosäuren des N-terminalen zytoplasmatischen Abschnittes von Synaptobrevin II (Edelmann 1995 in [66]). Der zytoplasmatische Teil von Synaptobrevin ist an der Interaktion mit Syntaxin während der Formierung des synaptischen Fusionskomplexes beteiligt, entscheidend sind hierbei aber die Aminosäuren 27 bis 94 der zentralen Region von Synaptobrevin [96]. Es ist daher möglich, daß durch die Bildung des Komplexes die Antikörperbindungsstelle von Synaptobrevin maskiert wird. Dadurch wäre ein Teil der Synaptobrevin-Moleküle an den Vesikeln nicht sichtbar. An den Vesikeln könnte aber auch Synaptobrevin I vorkommen, was durch den Antikörper nicht dargestellt wird [66]. Staple et al. wiesen am Beispiel von Synaptophysin, SV2 und Synapsin 1997 nach, daß sich die Mengen synaptischer Vesikelproteine innerhalb der Synapsen eines Neurons unterscheiden. Die Autoren vermuteten lokale posttranslationale Mechanismen als Ursache für diese Beobachtungen [97]. Diese Mechanismen könnten zu geringerem Vorkommen Synaptobrevins in einigen Präsynapsen beitragen. Das Fehlen an einzelnen Vesikeln, wie es beobachtet wurde, ist allerdings damit nicht erklärbar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der synaptischen Vesikelproteine Synaptophysin und Synaptobrevin bei Wachstum und Differenzierung in der primär dissoziierten hippocampalen Zellkultur zu untersuchen. Besonderes Interesse galt dabei dem Fortsatzwachstum und der Synaptogenese.

Zuerst wurde die neuronale Zellkultur von Hippocampi 17 Tage alter Mäuseembryonen charakterisiert. Die Beobachtung von Zellmorphologie und Zellwachstum zeigte, daß sich in der Kultur zwei neuronale Zelltypen, Pyramidenneurone und Körnerzellen, entwickeln. Es waren zwei verschiedene Körnerzelltypen nachweisbar, die sich im Verzweigungsmuster der Dendriten unterschieden. Diese beiden Typen sind auch *in vivo* nachgewiesen worden (Übersicht in [92]). Die Ausbildung charakteristischer Zelltypen scheint daher ein intrinsischer Prozeß der hippocampalen Neurone zu sein.

Schon nach 1 DIV bildeten die Perikarya neue Axone und Dendriten. Die deutliche räumliche Trennung der subzellulären Kompartimente weist die Neurone als polarisierte Zellen aus. Die weitere Entwicklung der Zellen in der Kultur war durch zunehmendes Wachstum, starke Vernetzung und Synaptogenese gekennzeichnet. Letztere wurde elektronenmikroskopisch und durch die Darstellung der Verteilung der synaptischen Vesikelproteine Synaptophysin und Synaptobrevin dokumentiert.

Synaptophysin ließ nach 1 bis 3 DIV vorwiegend im Perikaryon starke Immunreaktion erkennen, während die Fortsätze nur schwach gefärbt waren. Nach 3 bis 4 DIV waren erste immunreaktive Punkte an den Zellfortsätzen nachweisbar. In älteren Kulturen sah man punktuelle Immunreaktionen über die gesamte Kulturfläche verstreut. Das Perikaryon war bis auf den Bereich einer perinukleären Kappe ausgespart. Synaptobrevin zeigte ein ähnliches Verteilungsmuster. Beide Proteine wurden also nach 1 DIV im Perikaryon synthetisiert und nach 3 bis 4 DIV in den ersten Synapsen angereichert. In älteren Kulturen überzogen zahlreiche Synapsen die Kulturfläche und die Proteinsynthese im Perikaryon ließ nach.

Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen wurde die Differenzierung subzellulärer Strukturen der hippocampalen Zellkultur charakterisiert. Zellorganellen, Synaptogenese und die Verteilung von Synaptophysin und Synaptobrevin wurden dargestellt. Synaptophysin fand sich nicht nur in axonalen Präsynapsen, sondern auch in Dendriten.

Synaptobrevin war im Gegensatz zu Synaptophysin nicht in allen synaptischen Vesikeln der Axonterminalen darstellbar.

Um die Wirkungen von Synaptophysin und Synaptobrevin auf hippocampale Neurone in der Kultur genauer zu untersuchen, standen zwei Versuchsmodelle zur Verfügung: 1. die Synaptophysin-defiziente Maus und 2. clostridiale Neurotoxine, die Synaptobrevin spalten. Beide Modelle wurden angewandt und die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit dargestellt.

Anhand der Depletion von Synaptophysin wurde untersucht, ob *in vitro* das Fehlen des Proteins Konsequenzen in Bezug auf Synapsenbildung und morphologisches Erscheinungsbild der Neurone hat. Es konnten lichtmikroskopisch keine Unterschiede zu Kontrollkulturen festgestellt werden. Auch im elektronenmikroskopischen Bild der Kulturen synaptophysindefizienter Mäuse waren keine Unterschiede zu sehen. Durch morphometrische Messungen zeigte sich, daß in der Kultur der Synaptophysin-depletierten Maus nach 2 DIV mit hoher Signifikanz die Dendriten länger als in Kontrollkulturen waren. Dies spricht für allgemeine regulatorische Funktionen des Proteins bei Exo- und Endozytosevorgängen während des dendritischen Wachstums.

Synaptobrevin wird durch Tetanustoxin und die Botulinumneurotoxine B, D, F und G gespalten und inaktiviert [74,75,76,77]. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde Tetanustoxin angewandt. Nach Zugabe von Tetanustoxin zur pränatalen Zellkultur konnte gezeigt werden, daß die Inaktivierung von Synaptobrevin durch TeTx *in vitro* keine Konsequenzen in Bezug auf das morphologische Erscheinungsbild der Neurone, die Synapsenbildung und das Wachstumsverhalten hat. Durch Ermittlung eines minimal wirksamen Konzentrationsbereiches des Toxins konnten unspezifische toxische Wirkungen nahezu ausgeschlossen werden.

Durch morphometrische Messungen wurde untersucht, ob die Zugabe von Tetanustoxin zur

Zellkultur Auswirkungen auf das Wachstum von Axonen oder Dendriten sowie die Anzahl primärer Dendriten hat. Für TeTx-behandelte Neurone konnten keine hochsignifikanten Unterschiede zu Kontrollkulturen festgestellt werden. Synaptobrevin scheint also sowohl beim Axon- als auch beim Dendritenwachstum keine essentielle Rolle zu spielen.

6.1 Schlußfolgerungen

Die hippocampale Zellkultur ist ein geeignetes Modellsystem, um neuronales Wachstum, Entwicklung von Zellpolarität und Synaptogenese zu untersuchen. Die Entwicklung der Neurone in dieser Zellkultur ist vergleichbar mit der Entwicklung *in situ*.

Regulierte und konstitutive Exozytose in neuronalen Zellen sind Mechanismen, die Wachstum, Transportprozesse und Transmitterfreisetzung steuern. Beide Wege weisen Ähnlichkeiten bei der Zusammensetzung beteiligter Proteine auf.

Synaptophysin ist ein ubiquitär vorkommendes Membranprotein synaptischer Vesikel. In Dendriten ist Synaptophysin ebenfalls nachweisbar. Es hat regulatorische Funktionen beim Dendritenwachstum durch seine Mitwirkung bei Membranbiogenese und -recycling. Synaptophysin ist nicht essentiell für neuronales Wachstum, Synaptogenese und Transmitterfreisetzung.

Synaptobrevin ist ein integrales Membranprotein synaptischer Vesikel. Es weist eine ähnliche Verteilung wie Synaptophysin auf. Zusammen mit Syntaxin und SNAP-25 bildet es den Fusionskomplex der regulierten Exozytose. Es ist essentiell für die Transmitterfreisetzung. Bei neuronalem Wachstum und Synaptogenese hat Synaptobrevin keine Funktionen.

7 Literaturverzeichnis

1. Banker, G.A., Cowan, M. (1977). Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.* 126: 397 - 425
2. Dotti, C., Sullivan, C., Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 8(4): 1454 - 1468
3. Dotti, C., Banker, G.A. (1991). Intracellular organization of hippocampal neurons during the development of neuronal polarity. *J. Cell Sci. Supplement* 15: 75-84
4. Bartlett, W., Banker, G.A. (1984). An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships. *J. Neurosci.* 4: 1954-1965
5. Lindner, G., Grosse, G. (1982). Über den Einfluß der Kultivierungstechnik auf die Entwicklung des Hippocampus (Ratte) in vitro. *Z.mikrosk.-anat. Forsch.* 96: 527-536
6. Dotti, C., Banker, G.A. (1987). Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons. *Nature* 330: 254-256
7. Goslin, K., Banker, G.A. (1989). Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Cell Biol.* 108: 1507-1516
8. Diaz-Nido, J., Ulloa, L., Sanchez, C., Avila, J. (1995). The role of the cytoskeleton in the morphological changes occurring during neuronal differentiation. *Cell Dev. Biol.* 7: 733-739
9. Pfenninger, K.H., Friedmann, L.B. (1993). Sites of plasmalemmal expansion in growth cones. *Dev. Brain Res.* 71: 181-192
10. Lockerbie, R.O., Miller, V.E., Pfenninger, K.H. (1991). Regulated plasmalemmal expansion in nerve growth cones. *J. Cell Biol.* 112(6): 1215-1227
11. Dailey, M.E., Bridgman, P.C. (1993). Vacuole dynamics in growth cones: correlated EM and video observations. *J. Neurosci.* 13: 3375-3393
12. De Camilli, P. (1993). Exocytosis goes with SNAP. *Nature* 364: 378-388
13. Igarashi, M., Kozaki, S., Terakawa, S., Kawano, S., Ide, C., Komiya, Y. (1995). Growth cone collapse and inhibition of neurite growth by Botulinum neurotoxin C1: A t-SNARE is involved in axonal growth. *J. Cell Biol.* 134: 205-215
14. Fletcher, T.L., Cameron, P.L., DeCamilli, P., Banker, G.A. (1991). The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *J. Neurosci.* 11: 1617-1626
15. Matteoli, M., Takei, K., Perin, M.S., Südhof, T.C., DeCamilli, P. (1992). Exo-endocytotic recycling of synaptic vesicles in developing processes of cultured hippocampal neurons. *J. Cell Biol.* 117: 849-861
16. Fletcher, T.L., De Camilli, P., Banker, G.A. (1994). Synaptogenesis in hippocampal cultures: evidence indicating that axons and dendrites become competent to form synapses at different stages of neuronal development. *J. Neurosci.* 14(11): 6695-6706
17. Gähwiler, B.H. (1984). Development of the hippocampus in vitro: cell types, synapses and receptors. *J. Neurosci.* 11(4): 751-760
18. Kraszewski, K., Mundigl, O., Daniell, L., Verderio, C., Matteoli, M. (1995). Synaptic vesicle dynamics in living cultured hippocampal neurons visualized with CY3-conjugated antibodies directed against the luminal domain of synaptotagmin. *J. Neurosci.* 15: 4328-4342
19. Verderio, C., Coco, S., Fumagalli, G., Matteoli, M. (1995). Calcium-dependent glutamate release during neuronal development and synaptogenesis: different involvement of **Aga-IVA** and **Ctx-GVIA sensitive channels**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6449-6453

20. Kelly, R.B., Grote, E. (1993). Protein targeting in the neuron. *Annu.Rev.Neurosci.* 16: 95-127
21. Craig, A.M., Wyborski, R.J., Banker, G.A. (1995). Preferential addition of newly synthesized membrane protein at axonal growth cones. *Nature* 375: 592-594
22. Craig, A.M., Banker, G.A. (1994). Neuronal Polarity. *Annu.Rev.Neurosci.* 17: 267-310
23. Deitch, J.S., Banker, G.A. (1993). An electron microscopic analysis of hippocampal neurons developing in culture: Early stages in the emergence of polarity. *J.Neurosci.* 13(10): 4301-4315
24. Baas, P., Sinclair, G., Heidemann, S. (1987). Role of microtubules in the cytoplasmic compartmentation of neurons. *Brain Res.* 420: 73-81
25. Goslin, K., Schreyer, D.J., Skene, H.J.P., Banker, G.A. (1990). Changes in the distribution of GAP-43 during the development of neuronal polarity. *J.Neurosci.* 10: 588-602
26. Chin, L.S., Li, L., Ferreira, A., Kosik, K.S., Greengard, P. (1995). Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsinI-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92: 9230-9234
27. Osen-Sand, A., Staple, J.K., Naldi, E., Schiavo, G., Rossetto, O., Petitpierre, S., Malgaroli, A., Montecucco, C., Catsicas, S. (1995). Common and distinct fusion proteins in axonal growth and transmitter release. *J.Comp.Neurol.* 367: 222-234
28. Osen-Sand, A., Catsicas, M., Staple, J.K., Jones, K.A., Ayala, G., Knowles, J., Grenningloh, G., Catsicas, S. (1993). Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides in vitro and in vivo. *Nature* 364: 445-448
29. Matteoli, M., Takei, K., Cameron, R., Johnston, P.A., Hurlbut, P., Jahn, R., Südhof, T.C., DeCamilli, P. (1991). Association of rab3A with synaptic vesicles at late stages of the secretory pathway. *J.Cell Biol.* 115: 625-633
30. Südhof, T.C. (1995). Function of rab3 GDP-GTP Exchange. *Neuron* 18: 519-522
31. G. Fischer v. Mollard et al. (1991). A small G protein dissociates from vesicles during exocytosis. *Nature* 349: 79-82
32. Williamson, L.C., Neale, E.A. (1995). Syntaxin and 25-kDA synaptosomal-associated protein: Differential effects of botulinum neurotoxins C1 and A on neuronal survival. *J.Neurosci.Res.* 52: 569-583
33. Wallace, B.G. (1995). Signaling mechanisms indicating synapse formation. *Bio Essays* 18: 777-780
34. Sporns, O., Jenkinson, S. (1995). Potassium ion- and nitric oxide- induced exocytosis from populations of hippocampal synapses during synaptic maturation in vitro. *Neuroscience* 80: 1057-1073
35. Meffert, M.K., Calakos, N.C., Scheller, R.H., Schulman, H. (1994). Nitric oxide stimulates calcium-independent synaptic vesicle release. *Neuron* 12: 1235-1244
36. Calakos, N., , Scheller, R.H. (1995). Synaptic vesicle biogenesis, docking and fusion: A molecular description. *Physiol.Rev.* 76: 1-29
37. Rothman, J.E., Wieland, F.T. (1995). Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272: 227-234
38. Tixier-Vidal, A., Faivre-Bauman, A., Picart, R. Wiedenmann, B. (1988). Immunoelectron microscopic localization of synaptophysin in a Golgi subcompartment of developing hypothalamic neurons. *Neuroscience* 26: 847-861
39. Tixier-Vidal, A., Barret, A., Faivre-Bauman, A., Huttner, W.B., Wiedenmann, B. (1992). Differential expression and subcellular localization of secretogranin II and synaptophysin during early development of mouse hypothalamic neurons in culture.

Neuroscience 47: 967-978

40. Jahn, R., Schiebler, W., Ouimet, C., Greengard, P. (1985). A 38 000 dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82: 4137-4141
41. Wiedenmann, B., Franke, W. (1985). Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38 000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41: 1017-1028
42. Daly, C., Ziff, E.B. (1995). Post-transcriptional regulation of synaptic vesicle protein expression and the development control of synaptic vesicle formation. *J.Neurosci.* 17: 2365-2375
43. Eshkind, L.G., Leube, R.E. (1995). Mice lacking synaptophysin reproduce and form typical synaptic vesicles. *Cell Tissue Res.* 282: 423-433
44. Rehm, H., Wiedenmann, B., Betz, H. (1986). Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane. *EMBO J.* 5: 535-541
45. Lein, P.J., Banker, G.A., Higgins, D. (1992). Laminin selectively enhances axonal growth and accelerates the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *Dev. Brain Res.* 69(2): 191-197
46. Bergmann, M., Schuster, T., Grabs, D., Marquèze-Pouey, B., Betz, H., Traurig, H., Mayerhofer, A., Gratzl, M. (1993). Synaptophysin and synaptoporin expression in the developing rat olfactory system. *Dev. Brain Res.* 74: 235-244
47. Mundigl, O., Matteoli, M., Daniell, L., Thomas-Reetz, A., Matcalf, A., Jahn, R., DeCamilli, P. (1993). Synaptic vesicle proteins and early endosomes in cultured hippocampal neurons: Differential effects of Brefeldin A in axon and dendrites. *J.Cell Biol.* 122: 1207-1221
48. Cameron, P.L., Südhof, T.C., Jahn, R., DeCamilli, P. (1991). Colocalization of synaptophysin with transferrin receptors: implications for synaptic vesicle biogenesis. *J.Cell Biol.* 115: 151-164
49. Grabs, D., Bergmann, M., Schuster, T., Fox, P.A., Brich, M., Gratzl, M. (1994). Differential expression of synaptophysin and synaptoporin during pre- and postnatal development of the rat hippocampal network. *Eur.J.Neurosci.* 6: 1765-1771
50. Régnier-Vigouroux, A., Tooze, S.A., Huttner, W.B. (1991). Newly synthesized synaptophysin is transported to SLMVs via constitutive secretory vesicles and the plasma membrane. *EMBO J.* 10: 3589-3601
51. Parton, R.G., Simons, K., Dotti, C.G. (1992). Axonal and dendritic endocytic pathways in cultured neurons. *J.Cell Biol.* 119: 123-137
52. Johnston, P.A., Cameron, P.L., Stukenbrok, H., Jahn, R., DeCamilli, P., Südhof, T.C. (1989). Synaptophysin is targeted to similar microvesicles in CHO- and PC12-cells. *EMBO J.* 8: 2863-2872
53. Leube, R.E. (1994). Expression of the synaptophysin gene family is not restricted to neuronal and neuroendocrine differentiation in rat and human. *Differentiation* 56: 163-171
54. Knaus, P., Marquèze-Pouey, B., Scherer, H., Betz, H. (1990). Synaptoporin, a novel putative channel protein of synaptic vesicles. *Neuron* 5: 453-462
55. McMahon, H.T., Bolshakov, V.Y., Janz, R., Hammer, R.E., Siegelbaum, S.A., Südhof, T.C. (1995). Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93: 4760-4764
56. Fykse, E.M., Takei, K., Walch-Solimena, C., Geppert, M., Jahn, R., DeCamilli, P., Südhof, T.C. (1993). Relative properties and localizations of SV-protein isoforms: the case of the synaptophysins. *J.Neurosci.* 13: 4997-5007
57. Stenius, K., Janz, R., Südhof, T.C., Jahn, R. (1995). Structure of synaptogyrin (p29) defines novel synaptic vesicle protein. *J.Cell Biol.* 131: 1801-1809

58. Alder, J., Lu, B., Valtorta, F., Greengard, P., Poo, M. (1992). Calcium-dependent transmitter secretion reconstituted in *Xenopus* oocytes: requirement for synaptophysin. *Science* 257: 657-661
59. Alder, J., Xie, Z., Valtorta, F., Greengard, P., Poo, M. (1992). Antibodies to synaptophysin interfere with transmitter secretion at neuromuscular synapses. *Neuron* 9: 759-768
60. Thomas, L., Hartung, K., Langosch, D., Rehm, H., Bamberg, E., Franke, W.W., Betz, H. (1988). Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science* 242: 1050-1053
61. Calakos, N., Scheller, R.H. (1994). Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle. *J.Biol.Chem.* 269(40): 24534-24537
62. Washbourne, P., Schiavo, G., Montecucco, C. (1995). Vesicle-associated membrane protein-2 (synaptobrevin-2) forms a complex with synaptophysin. *Biochem. J.* 305: 721-724
63. Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A.J., Benfenati, F. (1993). Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259: 780-785
64. Popov, S.V., Poo, M. (1993). Synaptotagmin: a calcium-sensitive inhibitor of exocytosis. *Cell* 73: 1247-1249
65. Brose, N., Petrenko, A.G., Südhof, T.C., Jahn, R. (1992). Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256: 1021-1025
66. Edelman, L., Hanson, P.I., Chapman, E.R., Jahn, R. (1995). Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J.* 14: 224-231
67. Igarashi, M., Tagaya, M., Komiya, Y. (1995). The soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attached protein receptor complex in growth cones: molecular aspects of the axon terminal development. *J.Neurosci.* 17(4): 1460-1470
68. Becher, A., Drenckhahn, A., Pahner, I., Ahnert-Hilger, G. (1998). Der Synaptobrevin/Synaptophysin Komplex - ein Indikator der Reifung synaptischer Vesikel. 15.Arbeitstagung der anatomischen Gesellschaft Würzburg, 1998. Poster.
69. Prekeris, R., Terrian, D.M. (1995). Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for Ca²⁺-dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex. *J.Cell Biol.* 137(7): 1589-1601
70. Baumert, M., Maycox, P.R., Navone, F., DeCamilli, P., Jahn, R. (1989). Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18 000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain. *EMBO J.* 8: 379-384
71. Ahnert-Hilger, G., Kutay, U., Chahoud, I., Rapoport, T., Wiedenmann, B. (1995). Synaptobrevin is essential for secretion but not for the development of synaptic processes. *Eur.J.Cell Biol.* 70: 1-11
72. McMahon, H.T., Ushkaryov, Y.A., Edelman, L., Link, E., Binz, T., Niemann, H., Jahn, R., Südhof, T.C. (1993). Cellubrevin is an ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein. *Nature* 364: 346-349
73. Li, J.Y., Edelman, L., Jahn, R., Dahlström, A. (1995). Axonal transport and distribution of synaptobrevin I and II in the rat peripheral nervous system. *J.Neurosci.* 16(1): 137-147
74. Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Poverino de Laureto, P., DasGupta, B.R., Montecucco, C. (1992). Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359: 832-835
75. Yamasaki, S., Baumeister, A., Binz, T., Blasi, J., Link, E., Cornille, F., Roques, B., Fykse, E.M., Südhof, T.C., Jahn, R., Niemann, H. (1994). Cleavage of members of the synaptobrevin/VAMP family by types D and F botulinum neurotoxins and tetanus

- toxin. *J.Biol.Chem.* 269: 12764-12772
76. Schiavo, G., Shone, C.C., Rossetto, O., Alexander, F.C.G., Montecucco, C. (1993). Botulinum neurotoxin serotype F is a zinc endopeptidase specific for VAMP/Synaptobrevin. *J.Biol.Chem.* 268: 11516-11519
77. Yamasaki, S., Binz, T., Hayashi, T., Szabo, E., Yamasaki, N., Eklund, M., Jahn, R., Niemann, H. (1994). Botulinum neurotoxin type G proteolyzes the Ala81-Ala82 bond of rat synaptobrevin 2. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 200: 829
78. Poulain, B., Rossetto, O., Deloye, F., Schiavo, G., Tauc, L., Montecucco, C. (1993). Antibodies against rat brain vesicle-associated membrane protein (synaptobrevin) prevent inhibition of acetylcholine release by tetanus toxin or botulinum neurotoxin type B. *J. Neurochem.* 61: 1175-1178
79. Elferink, L.A., Trimble, W.S., Scheller, R.H. (1989). Two vesicle-associated membrane protein genes are differentially expressed in the rat central nervous system. *J.Biol.Chem.* 264: 11061-11064
80. Trimble, W.S., Gray, T.S., Elferink, L.A., Wilson, M.C., Scheller, R.H. (1990). Distinct patterns of expression of two VAMP genes within the rat brain. *J.Neurosci.* 10(4): 1380-1387
81. Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempest, P., Rothman, J.E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362: 318-324
82. Sweeney, S.T., Broadie, K., Keane, J., Niemann, H., O'Kane, C.J. (1995). Targeted expression of tetanus light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron* 14: 341-351
83. Littleton, J.T., Upton, L., Kania, A. (1995). Immunocytochemical analysis of axonal outgrowth in synaptotagmin mutations. *J.Neurochem.* 65: 32-40
84. Galli, T., Zahraoui, A., Vaidyanathan, V.V., Raposo, G., Tian, J.M., Karin, M., Niemann, H., Louvard, D. (1995). A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells. *Mol.Biol.Cell* 9: 1437-1448
85. Deitcher, D.L., Ueda, A., Stewart, B.A., Burgess, R.W., Kidokoro, Y., Schwarz, T.L. (1995). Distinct requirements for evoked and spontaneous release of neurotransmitter are revealed by mutations in the *Drosophila* gene neuronal-synaptobrevin. *J.Neurosci.* 18(6): 2028-2039
86. Hunt, J.M., Bommert, K., Charlton, M.P., Kistner, A., Habermann, E., Augustine, G.J., Betz, H. (1994). A post-docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion. *Neuron* 12: 1269-1279
87. Otto, H., Hanson, P.I., Jahn, R. (1995). Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 94: 6197-6201
88. Kretschmar, S., Volkandt, W., Zimmermann, H. (1995). Colocalization on the same synaptic vesicles of syntaxin and SNAP-25 with synaptic vesicle proteins: a re-evaluation of functional models required? *Neurosci.Res.* 26: 141-148
89. Patel, S.K., Indig, F.E., Olivieri, N., Levine, N.D., Latterich, M. (1995). Organelle membrane fusion: a novel function for the syntaxin homolog Ufe1p in ER membrane fusion. *Cell* 92: 611-620
90. Nichols, B.J., Ungermann, C., Pelham, H.R., Wickner, W.T., Haas, A. (1995). Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs. *Nature* 387: 199-202
91. Pellegrini, L.L., O'Connor, V., Lottspeich, F., Betz, H. (1995). Clostridial neurotoxins compromise the stability of a low energy SNARE complex mediating NSF activation of synaptic vesicle fusion. *EMBO J.* 14: 4705-4713
92. Gaarskjaer, F.B. (1986). The organization and development of the hippocampal mossy fiber system. *Brain Res.Rev.* 11: 335-357

93. Verderio, C., Coco, S., Fumagalli, G., Matteoli, M. (1994). Activity independent spatial changes in calcium signalling during the establishment of neuronal polarity. *J.Cell Biol.* 126: 1527-1536
94. Trimble, W.S., Cowan, D.M., Scheller, R.H. (1988). VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 85: 4538-4542
95. Poirier, M.A., Xiao, W.,Macosko, J.C., Chan, C., Shin, Y.-K., Bennett, M.K. (1995). The synaptic SNARE complex is a parallel fourstranded helical bundle. *Nat.Struct.Biol.* 5: 765-769
96. Lin, R.C., Scheller, R.H. (1995). Structural organization of the synaptic exocytosis core complex. *Neuron* 19: 1087-1094
97. Staple, J.K., Osen-Sand, A., Benfenati, F., Merlo-Pich, E., Catsicas, S. (1995). Molecular and functional diversity at synapses of individual neurons in vitro. *Eur.J.Neurosci.* 9: 721-731
98. Caceres, A., Banker, G., Steward, O., Binder, L., Payne, M. (1984). MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Dev.Brain Res.* 13: 314-318
99. Goslin,K, Schreyer, D.J., Skene, J.H.P., Banker, G. (1988). Development of neuronal polarity: GAP-43 distinguishes axonal from dendritic growth cones. *Nature* 336: 672-674
100. Grosse, G., Tapp, R., Wartenberg, M., Sauer, H., Fox, P.A., Grosse, J., Gratzl, M., Bergmann, M. (1995). Prenatal hippocampal granule cells in primary cell culture form mossy fiber boutons at pyramidal cell dendrites. *J.Neurosci.Res.* 51: 602-611
101. Südhof, T.C. (1990). The structure of the human synapsin I gene and protein. *J.Biol.Chem.* 265: 7849-7852
102. Südhof, T.C., Jahn, R. (1991). Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron* 6: 665-677
103. Perin, M.S.,Johnston, P.A., Özcelik, T., Jahn, R.,Francke, U., Südhof, T.C. (1991). Structural and functional conservation of synaptotagmin (p65) in Drosophila and humans. *J.Biol.Chem.* 266: 615-622
104. Matsui, Y., Kikuchi, A., Kondo, J., Hishida, T., Teranishi, Y., Takai, Y. (1988). Nucleotide and deduced amino acid sequences of a GTP-binding protein family with molecular weights of 25000 from bovine brain. *J.Biol.Chem.* 263: 11071-11074
105. Oyler, G.A., Higgins, G.A., Hart, R.A., Battenberg, E., Billingsley, M., Bloom, F.E., Wilson, M.C. (1989). The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J.Cell Biol.* 109: 3039-3052
106. Clary, D.O., Griff, I.C., Rothman, J.E. (1990). SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* 61: 709-721
107. Wilson, D.W., Whiteheart, S.W., Wiedmann, M., Brunner, M., Rothman, J.E. (1992). A multisubunit particle implicated in membrane fusion. *J. Cell Biol.* 117: 531-538
108. DeCamilli, P., Cameron, R., Greengard, P. (1983). Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. I.Its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections. *J. Cell Biol.* 96: 1337-1354
109. Bennett, M.K., Calakos, N., Scheller, R.H. (1992). Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257: 255-259
110. Wilson, D.W., Wilcox, C.A., Flynn, G.C., Chen, E., Kuang, W.J., Henzel, W.J., Block, M.R., Ulrich, A., Rothman, J.E. (1989). A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast. *Nature* 339: 355-359

111. Griff, I.C., Schekman, R., Rothman, J.E., Kaiser, C.A. (1992). The yeast SEC17 gene product is functionally equivalent to mammalian alpha-SNAP protein. *J.Biol.Chem.* 267: 12106-12115
112. Whiteheart, S.W., Brunner, M., Wilson, D.W., Wiedmann, M., Rothman, J.E. (1992). Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment proteins (SNAPs) bind to a multi-SNAP receptor complex in Golgi membranes. *J.Biol.Chem.* 267: 12239-12243
113. Tagaya, M., Wilson, D.W., Brunner, M., Arango, N., Rothman, J.E. (1993). Domain structures of an N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein involved in vesicular transport. *J.Biol.Chem.* 268: 2262-2266
114. Südhof, T.C., DeCamilli, P., Niemann, H., Jahn, R. (1993). Membrane fusion machinery: insights from synaptic proteins. *Cell* 75: 1-4
115. Rothman, J.E., Warren, G. (1994). Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr. Biol.* 4: 220-233
116. Söllner, T., Bennett, M.K., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H., Rothman, J.E. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75: 409-418
117. Pevsner, J., Hsu, S.-C., Braun, J.E.A., Calakos, N., Ting, A.E., Bennett, M.K., Scheller, R.H. (1994). Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. *Neuron* 13: 353-361
118. Jahn, R., Südhof, T.C. (1994). Synaptic vesicles and exocytosis. *Annu.Rev.Neurosci.* 17: 219-246
119. Südhof, T.C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375: 645-653
120. Ting, A.E., Scheller, R.H. (1995). Insights into the molecular mechanisms of synaptic vesicle docking and fusion. *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.* 60: 361-369
121. Bruns, D., Jahn, R. (1995). Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles. *Nature* 377: 62-65
122. Hanson, P.I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R., Heuser, J.E. (1995). Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* 90: 523-535
123. Mayer, A., Wickner, W., Haas, A. (1995). Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (- SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles. *Cell* 85: 83-94
124. Chapman, E.R., An, S., Barton, N., Jahn, R. (1994). SNAP-25, a t-SNARE which binds to both syntaxin and synaptobrevin via domains that may form coiled coils. *J.Biol.Chem.* 269: 27427-27432
125. Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Südhof, T.C., Niemann, H. (1994). Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J.* 13: 5051-5061
126. Fasshauer, D., Bruns, D., Shen, B., Jahn, R., Brünger, A.T. (1995). a structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25. *J.Biol.Chem.* 272: 4582-4590
127. Swanton, E., Sheehan, J., Bishop, N., High, S., Woodman, P. (1995). Formation and turnover of NSF- and SNAP-containing "fusion" complexes occur on undocked, clathrin-coated vesicle-derived membranes. *Mol.Biol.Cell* 9: 1633-1647
128. Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H., Rothman, J.E. (1995). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92: 759-772
129. Hanson, P.I., Heuser, J.E., Jahn, R. (1995). Neurotransmitter release - for years of SNARE complexes. *Curr.Op.Neurobiol.* 7: 310-315
130. Klingauf, J., Kavalali, E.T., Tsien, R.W. (1995). Kinetics and regulation of fast endocytosis at hippocampal synapses. *Nature* 394: 581-585

131. Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R., Brunger, A.T. (1995). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395: 347-353
132. Johnston, P.A., Jahn, R., Südhof, T.C. (1989). Transmembrane topography and evolutionary conservation of synaptophysin. *J.Biol.Chem.* 264: 1268-1273
133. Südhof, T.C., Baumert, M., Perin, M.S., Jahn, R. (1989). A synaptic vesicle membrane protein is conserved from mammals to drosophila. *Neuron* 2: 1475-1481
134. Burgess, T.C., Kelly, R.B. (1987). Constitutive and regulated secretion of proteins. *Ann.Rev.Cell.Biol.* 3: 243-293
135. Ahnert-Hilger, G., Bigalke, H. (1995). Molecular aspects of tetanus and botulinum neurotoxin poisoning. *Prog.Neurobiol.* 46: 83-96
136. Cornille, F., Martin, L., Lenoir, C., Cussac, D., Roques, B.P., Fournie-Zaluski, M.-C. (1995). Cooperative exosite-dependent cleavage of synaptobrevin by tetanus toxin light chain. *J.Biol.Chem.* 272: 3459-3464
137. Pellizzari, R., Rossetto, O., Lozzi, L., Giovedi, S., Johnson, E., Shone, C.C., Montecucco, C. (1995). Structural determinants of the specificity for synaptic vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin of tetanus and botulinum type B and G neurotoxins. *J.Biol.Chem.* 271: 20353-20358
138. Tonello, F., Morante, S., Rossetto, O., Schiavo, G., Montecucco, C. (1995). Tetanus and botulinum neurotoxins: a novel group of zinc-endopeptidases. *Adv.Exp.Med.Biol.* 389: 251-260
139. Blasi, J., Chapman, E.R., Link, E., Binz, T., Yamasaki, S., DeCamilli, P., Südhof, T.C., Niemann, H., Jahn, R. (1993) Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 365: 160-163
140. Blasi, J., Chapman, E.R., Yamasaki, S., Binz, T., Niemann, H., Jahn, R. (1993) Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J.* 12: 4821-4828
141. Williamson, L.C., Halpern, J.L., Montecucco, C., Brown, J.E., Neale, E.A. (1995). Clostridial neurotoxins and substrate proteolysis in intact neurons. *J.Biol.Chem.* 271: 7694-7699
142. Binz, T., Blasi, J., Yamasaki, S., Baumeister, A., Link, E., Südhof, T., Jahn, R., Niemann, H. (1994). Proteolysis of SNAP 25 by types E and A botulinum neurotoxins. *J.Biol.Chem.* 269: 1617-1620
143. Montecucco, C., Schiavo, G., Tugnoli, V., deGrandis, D. (1995). Botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic applications. *Mol.Med.Tod. Oct.:* 418-424
144. El Far, O., Charvin, N., Leveque, C., Martin-Moutot, N., Takahashi, M., Seagar, M.J. (1995). Interaction of a synaptobrevin (VAMP)-syntaxin complex with presynaptic calcium channels. *FEBS Lett.* 361: 101-105
145. Matthews, G. (1995). Neurotransmitter release *Annu.Rev.Neurosci.* 19: 219-233
146. Jahn, R., Hanson, P.I., Otto, H., Ahnert-Hilger, G. (1995). Botulinum and tetanus neurotoxins: emerging tools for the study of membrane fusion. *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.* 60: 329-335
147. Große, J., Große, G., Tapp, R., Kuchinke, J., Gorsleben, M., Fetter, I., Höhne-Zell, B., Gratzl, M., Bergmann, M. (1998). t-SNARE SNAP-25 ist im Gegensatz zu v-SNARE Synaptobrevin am dendritischen und axonalen Wachstum von hippocampalen Neuronen beteiligt. 15.Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, 1998. Poster.

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Übersicht einiger Vertreter von wichtigen Proteinfamilien der regulierten Exozytose...	7
Tab. 2:	Clostridiale Neurotoxine und ihre Substrate	13
Tab. 3:	Liste der verwendeten Primärantikörper, Eigenschaften und Arbeitskonzentration...	20
Tab. 4:	Liste der verwendeten Sekundärantikörper, Eigenschaften und Arbeitskonzentration	21
Tab. 5:	Eigenschaften und Arbeitskonzentrationen der Primärantikörper beim Western-Blot	23
Tab. 6:	Phänotypische Parameter von Pyramiden- und Körnerzellen bei 6 DIV	27
Tab. 7:	Neuronale Zelldichte bei 2 und 6 DIV	27
Tab. 8:	Ergebnisse der morphometrischen Messungen bei 2 DIV (TeTx)	48
Tab. 9:	Ergebnisse der morphometrischen Messungen bei 6 DIV (TeTx)	48
Tab. 11:	Morphometrische Messungen bei 2DIV (SY-knock-out)	49

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Der Zyklus synaptischer Vesikel.....	6
Abb. 2:	Schema der Membranfusion.....	9
Abb. 3:	Modell von Synaptophysin.	11
Abb. 4:	Modell von Synaptobrevin und Darstellung der Toxinspaltungsstellen.	12
Abb. 5:	Phasenkontrastbild der hippocampalen Zellen nach 1DIV	24
Abb. 6:	Phasenkontrastbild einer Körnerzelle (G/1) vom unverzweigten Typ nach 2 DIV	25
Abb. 7:	Phasenkontrastbild einer Körnerzelle (G/2) vom verzweigten Typ nach 2 DIV	25
Abb. 8:	Phasenkontrastbild einer Pyramidenzelle nach 2 DIV	25
Abb. 9:	Phasenkontrastbild einer Körnerzelle (G/1) vom unverzweigten Typ nach 6 DIV	26
Abb. 10:	Phasenkontrastbild einer Körnerzelle (G/2) vom verzweigten Typ nach 6 DIV	26
Abb. 11:	Phasenkontrastbild einer Pyramidenzelle nach 6 DIV	26
Abb. 12:	Mehrere typische Körnerzellen (G) nach 18 DIV	26
Abb. 13:	Pyramidenzelle nach 18 DIV	26
Abb. 14:	Astrozyten in der hippocampalen Zellkultur; 18 DIV	28
Abb. 15:	Elektronenmikroskopisches Bild einer neuronalen Zelle nach 6 DIV	28
Abb. 16:	Elektronenmikroskopisches Bild einer neuronalen Zelle nach 6 DIV	29
Abb. 17:	Elektronenmikroskopisches Bild einer neuronalen Zelle nach 6 DIV	29
Abb. 18:	Elektronenmikroskopisches Bild eines Axons nach 6 DIV	30
Abb. 19:	Elektronenmikroskopisches Bild von Axonen nach 6 DIV	30
Abb. 20:	Elektronenmikroskopisches Bild eines Axons nach 32 DIV	31
Abb. 21:	Elektronenmikroskopisches Bild von Moosfasern nach 36 DIV	31
Abb. 22:	Elektronenmikroskopisches Bild von Axonen nach 32 DIV	32
Abb. 23:	Verteilung von Synaptophysin nach 1 DIV	33
Abb. 24:	Verteilung von Synaptophysin nach 2DIV	33

Abb. 25: Verteilungsmuster von Synaptophysin nach 3 DIV	33
Abb. 26: Verteilung von Synaptophysin nach 4 DIV	34
Abb. 27: Verteilung von Synaptophysin nach 6 DIV	34
Abb. 28: Verteilung von Synaptophysin nach 18 DIV	35
Abb. 29: Verteilung von Synaptophysin nach 20 DIV	35
Abb. 30: Verteilung von Synaptophysin nach 20 DIV	35
Abb. 31: Immunoblot für Synaptophysin bei 1, 7 und 14 DIV	36
Abb. 32: Verteilung von Synaptobrevin nach 6 DIV	36
Abb. 33: Verteilung von Synaptobrevin nach 14 DIV	37
Abb. 34: Elektronenmikroskopisches Bild einer axosomatischen Synapse nach 14 DIV	38
Abb. 35: Elektronenmikroskopisches Bild nach 14 DIV, Synaptophysinmarkierung	38
Abb. 36: Elektronenmikroskopisches Bild einer axodendritischen Synapse nach 15 DIV	39
Abb. 37: Konzentrationsabhängige Spaltung von VAMP-2 durch Tetanustoxin, Kontrolle	40
Abb. 38: Konzentrationsabhängige Spaltung von VAMP-2 durch Tetanustoxin, 0,1pM TeTx ..	41
Abb. 39: Konzentrationsabhängige Spaltung von VAMP-2 durch Tetanustoxin, 10pM TeTx ..	41
Abb. 40: Konzentrationsabhängige Spaltung von VAMP-2 durch Tetanustoxin, 100pM TeTx .	42
Abb. 41: Konzentrationsabhängige Spaltung von VAMP-2 durch Tetanustoxin, 1nM TeTx	42
Abb. 42: Einfluß von TeTx auf die Zellkultur nach 5 DIV	43
Abb. 43: Einfluß von TeTx auf die Zellkultur nach 12 DIV	43
Abb. 44: Nachweis verschiedener synaptischer Vesikelproteine im Westernblot nach 8 DIV ..	44
Abb. 45: Darstellung von VAMP-2, Synaptophysin-knock-out-Maus nach 6 DIV	45
Abb. 46: Darstellung von VAMP-2, Synaptophysin-knock-out-Maus nach 6 DIV	45
Abb. 47: Fehlende Immunreaktion für Synaptophysin, Synaptophysin-knock-out-Maus.....	45
Abb. 48: Darstellung von Synaptoporin nach 13 DIV, Synaptophysin-knock-out-Maus	45
Abb. 49: Elektronenmikroskopisches Bild nach 13 DIV, SY-knock-out-Maus	46
Abb. 50: Immunoblot für Synaptophysin und VAMP-2, Kontroll- und SY-knock-out-Maus.....	47
Abb. 51: Immunoblot für Synaptoporin, Kontroll- und Synaptophysin-knock-out-Maus.....	47

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ATP	Adenosintriphosphat
BoTx	Botulinumneurotoxin
Ca	Kalzium
DIV	Day(s) <i>in vitro</i> , Tag(e) <i>in vitro</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAP-43	Growth Associated Protein, Wachstum-assoziiertes Protein
GFAP	Glial fibrillary acidic protein, Gliales Fibrilläres Saures Protein
HRP	Horse-radish peroxidase, Meerrettichperoxidase
kD	Kilodalton
LDCV	Large dense core vesicle, große dichte Vesikel
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
Mg	Magnesium
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NGF	Nerve Growth Factor, neuronaler Wachstumsfaktor
NO	Nitric oxide, Stickoxid
NSF	N-ethylmaleimide sensitiv fusion protein
PBS	Phosphat Buffer Saline
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean, Standardabweichung des Mittelwertes
SLMV	Small synaptic like micro vesicle, dem SSV ähnlicher Vesikel
SNAP(s)	Soluble NSF attachment proteins, lösliche NSF-bindende Proteine
SNAP-25	Synaptosomal associated protein of 25 kDa
SNARE	SNAP-Rezeptor-Protein
SO	Synaptoporin
SSV	Small synaptic vesicle, kleiner synaptischer Vesikel
SY	Synaptophysin
Tab.	Tabelle
TeTx	Tetanusneurotoxin
t-SNARE	Target-membrane associated SNAP-receptor protein
VAMP	Vesicle associated membran protein, Vesikelmembran-assoziiertes Protein, Synaptobrevin

v-SNARE	Vesicle-membrane associated SNAP-receptor protein
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. G. Große für die freundliche Überlassung des Themas und die jederzeit sehr gute Betreuung während der Arbeit. Durch ihre langjährige Erfahrung bei der Herstellung neuronaler Zellkulturen wurde die vorliegende Arbeit überhaupt erst möglich.

Desweiteren möchte ich Frau Dr. R.Tapp für die hervorragende Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen herzlich danken.

Für die freundliche Einarbeitung und hilfreiche Unterstützung bei den Arbeitstechniken bin ich Frau A.Löchner sehr dankbar.

Nicht unerwähnt lassen möchte ich Frau Roeseler (Elektronenmikroskopie), Frau Wachenschwanz, Frau Lewandowski (Fotoabteilung) und Herrn Kuchinke, die mit ihrer Hilfe und technischen Unterstützung zu den Ergebnissen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich möchte mich außerdem bei meinen Eltern für die mir in jeglicher Hinsicht erwiesene Unterstützung des Studiums und dieser Arbeit bedanken.

Lebenslauf

Name, Vorname: Gorsleben, Martin
geboren am: 03.07.1973
Geburtsort: Neuruppin
Anschrift: Kastanienallee 11
10435 Berlin
Familienstand: ledig

1980 - 1992 Polytechnische und Erweiterte Oberschule, Neuruppin
25.06.1992 Abitur
1992 - 1993 Zivildienst

1993 - 2000 Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität
zu Berlin (Charité)

1999 - 2000 PJ in Berlin (Innere Medizin, Neurologie) und Burgdorf
(Schweiz, Chirurgie)

Berlin, den 03.12.1998

Martin Gorsleben

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, die vorliegende Dissertationsarbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter unter ausschließlicher Nutzung der aufgeführten Materialien, Methoden und Literaturquellen angefertigt zu haben.

Berlin, den 03.12.1998

Martin Gorsleben